

# **Remodeling des Glanzstreifens und Connexin-Expression am chronisch erkrankten menschlichen Herzen**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Markus Rieger  
aus Karlsruhe

Gießen 2003

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung  
Kerkhoff-Institut  
Abteilung Experimentelle Kardiologie  
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper  
In Bad Nauheim

Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Dr. h.c. J. Schaper  
Gutachter: Herr Prof. Dr. med. R. Bohle

Tag der Disputation: 03.05.2004

Diese Arbeit ist meinen Eltern Wolfgang und Renate Rieger gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Index</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1. Gewebe	10
2.1.1. Patientengruppen	10
2.1.2. Gewebegewinnung	11
2.1.3. Gewebeaufbewahrung	11
2.2. Herstellung histologischer Präparate	11
2.2.1. Färbungen	11
2.2.1.1. Herstellung von Hämatoxylin-Eosin Präparaten	12
2.2.1.2. Herstellung immunhistologischer Präparate	12
2.2.1.2.a) Schneiden	12
2.2.1.2.b) Fixieren	13
2.2.1.2.c) Färben	13
2.2.1.2.d) Eindeckeln	13
2.2.1.2.1. Einzelfärbung	13
2.2.1.2.2. Doppelfärbung	15
2.2.2. Standardisierung der Färbetechnik	16
2.2.3. Antikörper	17
2.2.3.1. 1. Antikörper	17
2.2.3.2. 2. Antikörper	18
2.2.3.3. 3. Antikörper	19
2.2.3.4. Sonstige Farbstoffe	19
2.2.4. Aufbewahrung der Präparate	19
2.3. Lichtmikroskopie	19
2.4. Fluoreszenzmikroskopie	20
2.4.1. Herstellung von Bildern zur Beurteilung der Morphologie	21
2.4.2. Herstellung von Bildern zur Quantifizierung	21
2.4.3. Speicherung der Daten	22
2.4.4. Standardisierung von Bildaufnahme und Messung	22
2.5. Messung der Fluoreszenzintensität	23
2.5.1. Durchschnittsintensität pro Glanzstreifen	23
2.5.2. Fläche und Dichte der Gap Junctions pro Zellfläche	24



2.5.3.	Gap Junctionfläche pro Zellvolumen	27
2.5.4.	Korrelation von Gap Junctionfläche und Zellgröße	27
2.6.	Statistische Auswertung	28
2.7.	Elektronenmikroskopie	28
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1.	Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen der Zell-Zell-Kontakte	29
3.1.1.	Kontrollgewebe	29
3.1.2.	Pathologisch verändertes Gewebe	32
3.1.2.1.	Ischämische Kardiomyopathie	32
3.1.2.2.	Idiopathische dilatative Kardiomyopathie	36
3.1.2.3.	Myokarditis	39
3.2.	Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen	40
3.2.1.	Connexin 43 Dichte pro Glanzstreifen	40
3.2.2.	Connexin 43 Dichte pro Zellfläche	41
3.2.3.	Gap Junctionfläche pro Zellfläche	41
3.2.4.	Gap Junctionfläche pro Zellvolumen	43
3.2.5.	Zellgrößenverteilung	45
3.2.6.	Korrelation von Gap Junctionfläche und Zellgröße	47
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
	<b>Summary</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>61</b>
6.1.	PBS-Lösung	61
6.2.	Mowiol-Einbettmedium	61
6.3.	Objektträger beschichten	61
<b>7.</b>	<b>Literaturnachweis</b>	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>70</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>71</b>

# 1. Einleitung

Alle, auch die einfachsten mehrzelligen Organismen bedürfen einer Koordination und Integration der Funktion ihrer Einzelzellen in den Gesamtorganismus. Dazu müssen die Zellen in der Lage sein, sich zu einem festen Verband zusammenzufügen, sich auszudifferenzieren und untereinander Informationen auszutauschen. Auf den Herzmuskel übertragen entspricht der Verband dem Myokard, der Gesamtheit aller Kardiomyozyten, die Informationsweiterleitung entspricht hier der elektrophysiologischen Kopplung der Zellen.

Die elektrophysiologische und mechanische Integration der Herzmuskelzellen als funktionelles Synzytium wird durch drei interzelluläre Bindungen des Glanzstreifens bewirkt<sup>1-7</sup>:

1. die Macula Adhaerens (Desmosomen)
2. die Fascia Adhaerens
3. die Nexus (Gap Junctions)

Die normale, geregelte Kontraktion des Herzens ist sowohl abhängig von der aktiven Ionenströmung am Sarkolemm, als auch von den passiven elektrophysiologischen Eigenschaften der Zelle. Die passiven Eigenschaften beziehen sich auf die Architektur des Gewebeaufbaus und auf spezialisierte Zellverbindungen, welche für die elektrische Kopplung und die interzelluläre Verbindung verantwortlich sind. Durch Größe und Oberflächengestaltung, aber auch durch die räumliche Anordnung der Kardiomyozyten im Myokard ist der Einfluss der Gewebearchitektur ebenso definiert wie durch die Zusammensetzung des Interstitiums<sup>8-10</sup>.

Während die Desmosomen und die Fascia Adhaerens für die mechanische Kopplung der Zellen zuständig sind, sind die Gap Junctions für die Erregungsweiterleitung im Herzmuskel bedeutend, weil sie an der Regelung der elektrophysiologischen Kopplung der Zellen beteiligt sind.

Die Gap Junctions bestehen aus einer Zusammenlagerung mehrerer Kanäle in der Zellmembran, die zwei benachbarte Zellen miteinander verbinden. Die Kanäle können sowohl geschlossen, als auch geöffnet werden. Auf diese Weise sind sie in der Lage, unter Umgehung des extrazellulären Raumes, den direkten Austausch von Ionen und kleineren Molekülen zwischen den Zellen zu regulieren. Die Gap Junctions kommen im Herzmuskelgewebe nur im Bereich der Glanzstreifen vor, so dass sie nur die Zellen verbinden, die in Reihe geschaltet sind, nicht aber die Zellen, die parallel nebeneinander liegen<sup>11-16</sup>. Somit ist gewährleistet, dass sich die Erregung gerichtet über das Myokard ausbreitet, und sich die Myozyten nicht diffus, und somit ineffizient kontrahieren.

Diese Kanäle werden durch Connexone gebildet und haben einen inneren Durchmesser von ca. 2,5 nm in ihrer weitesten Ausdehnung. Dazu werden von jeder der beteiligten Zellen transmembranöse Hemichannels gebildet, die dann zusammengenommen ein Connexon bilden. Die Hemichannels wiederum sind durch eine hexalaminare Zusammenlagerung von sechs jeweils gleichen Connexinen aufgebaut.

Neuere Untersuchungen zeigten, dass bei Säugetieren 17 verschiedene Connexinisoformen vorkommen, die entsprechend ihres Molekulargewichtes eingeteilt werden<sup>17-19</sup>. Beim Menschen konnten derzeit 12 Chromosomenlokalisationen für unterschiedliche Isoformen gefunden werden. Im Einzelnen sind dies die Gene für Connexin 26, 30, 30.3, 31, 31.1, 32, 36, 37, 40, 43, 46, 50. Die entsprechenden Gene für Connexin 29, 33, 45, 47 und 57 konnten bislang lediglich bei der Maus festgestellt werden<sup>18</sup>.

Es sind am Herzmuskel vier verschiedene Connexine bekannt, welche als Grundbausteine der hier vorkommenden Gap Junctions anzusehen sind. Dies sind im einzelnen das Connexin 37, Connexin 40, Connexin 43 und Connexin 45. Die Connexine des Glanzstreifens sind Proteine von 40kD Molekulargewicht (Connexin 40), 43kD (Connexin 43) oder 45kD (Connexin 45). Das Connexin 37 (37kD) ist auf das Endothel der Gefäße beschränkt. Je nach Phosphorylierungszustand der Connexine und abhängig vom pH-Wert sind die Kanäle geöffnet oder geschlossen<sup>20</sup>.

Der Unterschied zwischen den einzelnen Connexinen liegt in der unterschiedlichen Erregungsleitungsgeschwindigkeit und in der differierenden Molekularmasse. Aufgrund des Unterschiedes in der Erregungsleitungsgeschwindigkeit werden die drei Connexine auch in verschiedenen Regionen des Herzmuskels exprimiert. Das Connexin 40 ist hauptsächlich im Bereich des rechten Vorhofes, des Sinusknotens und der Leitungsbahnen (Purkinje-Fasern, Hiss-Bündel) lokalisiert, aber auch in der Muskularis der Gefäße<sup>21-33</sup>, während Connexin 43 ubiquitär im Herzmuskel, jedoch hauptsächlich in den Glanzstreifen des Arbeitsmyokards zu finden ist<sup>26,31,34-41</sup>. Connexin 45 findet sich in geringen Mengen sowohl im Bereich des rechten Vorhofes, als auch im Ventrikel<sup>14,42-44</sup>.

Die Rolle der Gap Junctions bei der elektrophysiologischen Kopplung der Zellen ist sowohl durch die Isoform des Connexins, als auch durch ihre Größe, Anzahl und räumliche Verteilung im Glanzstreifen festgelegt<sup>14,15,29,39,45-50</sup>.

Gap Junctions sind, wie bereits erwähnt, für die gerichtete, normale Kontraktion des Myokards notwendig. Kommt es also zu Veränderungen quantitativer und/oder qualitativer Art, so kann keine normale Aktion mehr stattfinden. Die Tatsache, dass die Gap Junctions maßgeblich an der elektrophysiologischen Kopplung beteiligt sind, führt zu der Hypothese, dass sich Veränderungen der Connexine bei Erkrankungen des Herzens proarrhythmogen auswirken können. Diese Annahme hat sich im Laufe des letzten Jahrzehnts immer mehr bestätigt<sup>21,51-61</sup>.

Schwere Arrhythmien führen, einhergehend mit weiteren durch die Grunderkrankung bedingten, pathologischen Veränderungen am Herzmuskel, in der Endphase von dilatativen Kardiomyopathien (DCM), Myokarditiden und koronarer Herzerkrankung (KHK) zu einer globalen Insuffizienz des Herzmuskels. Diese geht einher mit einer Verminderung der Ejektionsfraktion (EF) auf unter 20% und ist mit einem erhöhten Vorkommen

lebensbedrohlicher Arrhythmien und des plötzlichen Herztodes vergesellschaftet. In diesem Zustand kommt als Therapie nur noch die Transplantation in Frage.

Man teilt Arrhythmien entsprechend ihres Entstehungsortes, ihrer Häufigkeit und ihres Schweregrades in verschiedene Klassen ein. Die grundlegende Unterteilung stellt die in bradykarde und tachykarde Arrhythmien dar.

Tachykarde Arrhythmien werden in supraventrikulär und ventrikulär unterschieden. Supraventrikuläre Tachykardien entstehen, wenn es im Vorhof, bzw. im AV-Knoten zu Erregungsstörungen kommt. Ursache können fehlende vagale Hemmung von Sinusknoten oder AV-Knoten, aber auch ektope Erregungszentren sein. Ein weiteres Phänomen, welches zu supraventrikulären Tachykardien führen kann, ist der Reentry-Mechanismus, bei dem durch eine rückwärts gerichtete Erregung entlang eines akzessorischen Leitungsbündels der Sinusknoten, der Vorhof oder aber das Myokard, welches nicht mehr refraktär ist, neu angeregt wird. Typische Beispiele für dieses Phänomen sind das Wolf-Parkinson-White- bzw. das Lown-Ganong-Levine-Syndrom.

Ventrikuläre Tachykardien treten auf, wenn ein dem AV-Knoten nachgeschaltetes Erregungszentrum den Ventrikel unabhängig von der Vorhofaktion zur Kontraktion veranlasst, oder es durch den oben schon erwähnten Reentry-Mechanismus zu Extrasystolen des Ventrikels kommt. Durch die sich diffus ausbreitenden Aktionspotentiale kann es zu Kammerflattern oder sogar Kammerflimmern kommen, was häufig bei dilatativen Kardiomyopathien, aber auch bei anderen schweren Erkrankungen des Herzens der Fall ist und dort zu schwerwiegenden Komplikationen führt.

Der hier beschriebene Reentry-Mechanismus kann nur dann zustande kommen, wenn sich die Aktionspotentiale entgegen ihrer normalen Ausbreitungsrichtung auf Areale des Myokards ausbreiten können, die schon depolarisiert waren, aber nicht mehr refraktär sind, oder wenn sich die Erregung unterschiedlich schnell über den Ventrikel ausbreitet. Es können sogenannte „accessory-pathways“ entstehen, durch die der AV-Knoten retrograd wieder erregt wird. Dies führt zu einem regelrechten „circulus vitiosus“, denn es kann hier zu kreisenden Erregungen kommen, die mit einer ausreichenden Ventrikelfunktion nicht mehr vereinbar sind.

Diese Studie befasst sich mit den möglichen pathogenetischen Faktoren von ventrikulären Arrhythmien, welche durch Veränderungen der passiven Erregungsleitung entstehen können. Die passive Erregungsleitung ist abhängig von den im Glanzstreifen vorkommenden Gap Junctions.

Die Informationen über quantitative Veränderungen des Gap Junction - Besatzes und über qualitative Veränderungen der Connexinisoformen im Zusammenhang mit chronischen Herzerkrankungen des Menschen sind immer noch bruchstückhaft und bedürfen deshalb weiterer Untersuchungen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Veränderungen des Connexin 43, da es, im Verhältnis zu den anderen beiden untersuchten Connexinen am häufigsten im ventrikulären Arbeitsmyokard exprimiert wird. Es stellte sich uns die Frage, inwieweit qualitative und/oder quantitative Veränderungen dieses Proteins Einfluss auf die oben beschriebenen Mechanismen der Tachyarrhythmien nehmen, welche im Ventrikel, unabhängig vom Erregungsleitungssystem, z.B. durch Störung der Erregungsleitung im Arbeitsmyokard oder Reentry-Mechanismen entstehen können. Es war unser Ziel, durch die Nutzung immunhistologischer Verfahren und konfokaler Lasermikroskopie Daten zu erheben, die nur den Anteil des Gap Junction - Proteins Connexin 43 darstellen, der an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt ist. Auf diese Weise war es möglich, den aktuellen Status des Gap Junction - Besatzes zum Zeitpunkt der Transplantation festzustellen, da bis heute noch ungeklärt war, auf welcher Ebene, von der Proteinbiosynthese bis zum Membraneinbau der Kanäle, eine Störung vorliegen könnte.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Gewebe

Das Gewebe, das in der vorliegenden Studie untersucht wurde, ist ausschließlich menschlicher Herkunft. In den nachgestellten Kapiteln ist dargelegt, aus welcher Patientengruppe das Gewebe stammt, wie es gewonnen wurde und wie es bearbeitet wurde.

#### 2.1.1 Patientengruppen

Die Patientengruppen wurden nach ihrer Grunderkrankung eingeteilt. Diese Studie befasst sich mit drei Grunderkrankungen des Herzens:

1. Idiopathische dilatative Kardiomyopathie (DCM, „dilated cardiomyopathy“)
2. Koronare Herzerkrankung (ICM, „ischemic cardiomyopathy“)
3. Myokarditis (MYO, „myocarditis“)

Eine weitere zu untersuchende Gruppe war die Kontrollgruppe, also Myokard, welches nicht pathologisch verändert war. Dieses Material stammt zum einen von Patienten, die an einer Mitralstenose erkrankt waren und deren Myokard noch nicht pathologisch verändert war. Zum anderen stammt das Gewebe teilweise auch von Unfallopfern, deren Herz nicht für eine Transplantation in Frage kam.

Tabelle 1 Patientendaten

Gewebe	n	Jahre	Geschlecht	EF (%)	NYHA
Kontrolle	8	51,5 ± 6,3	6 M, 2 W	≥ 60	-
DCM	7	48,8 ± 7,7	7 M	14 ± 1,6	alle IV
ICM	7	54,8 ± 2,4	7 M	21 ± 2,2	alle IV
MYO	6	43,4 ± 5,8	4 M, 2 W	23 ± 4,3	alle IV

### **2.1.2. Gewebegewinnung**

Das menschliche Gewebe stammt von transplantierten Patienten, so genannten „end-stage-heart-failure“ Patienten. Patienten also, deren Ejektionsfraktion  $< 20\%$  lag und die somit unmittelbar transplantationsbedürftig wurden. Das Gewebe wurde uns freundlicherweise von der Kerckhoff – Klinik Bad Nauheim zur Verfügung gestellt.

Nach der Explantation wurde das Herz sofort in entsprechende Probengröße geschnitten und in flüssigem Stickstoff bei  $-180^{\circ}\text{C}$  eingefroren, um postoperative Veränderungen zu vermeiden. Das Gewebe wurde entsprechend der Topographie des Herzens in 6 Teilgruppen unterteilt: 1. Rechtes Atrium, 2. Linkes Atrium, 3. Rechter Ventrikel, 4. Linker Ventrikel, 5. Septum und 6. Papillarmuskel. Bei den Patienten mit koronarer Herzerkrankung wurde noch eine weitere Einteilung, nach der so genannten „border – zone“, eingeführt, dem Gebiet also, das direkt an die Infarktregion anschließt.

Unser Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Endomyokardium bzw. auf dem Midmyokardium, weil die Kontrollgewebe zum Teil als Probeexcisionen bei Katheteruntersuchungen vom Herzlumen her gewonnen worden waren und somit nur dieser Bereich als Vergleich zur Verfügung stand.

Das Gewebe des rechten Vorhofes ist als Kontrollgewebe zur Untersuchung von Connexin 40 Gap Junctions von großer Bedeutung, deren Vorkommen hier besonders stark ausgeprägt ist.

### **2.1.3 Gewebeaufbewahrung**

Das Gewebe wurde nach der Gewinnung bzw. nach dem Einfrieren in speziellen Kühltruhen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. Es wurden keine weiteren Fixationsvorgänge der Gewebeblöcke durchgeführt.

## **2.2. Herstellung histologischer Präparate**

### **2.2.1 Färbungen**

Wir verwendeten für unsere Untersuchungen verschiedene Färbetechniken, die im Nachfolgenden näher beschrieben sind.

#### **2.2.1.1. Herstellung von Hämatoxilin–Eosin – Präparaten (HE)**

Diese Färbung wurde bei allen Gewebeproben an Schnitten von  $5\text{ }\mu\text{m}$  angewandt, um vor ihrer weiteren Verwendung festzustellen, ob diese überhaupt verwendbar sind, da nur streng

transversal oder longitudinal geschnittenes Gewebe für unsere Untersuchungen verwendbar war. So konnte durch sorgfältige, gewebserhaltende Maßnahmen überprüft werden, ob die Schnitte in der entsprechenden Ebene ausgeführt waren, oder ob die Schnittrichtung geändert, bzw. das Präparat neu aufgeblickt werden musste.

Ein weiterer Grund für das Anfertigen dieser Präparate war, dass Gefrierartefakte ausgeschlossen werden sollten.

Tabelle 2HE-Färbung

Schritt	Material/Vorgehensweise	Zeit
1.	Mit Hämatoxin überschichten.	10 Minuten
2.	Unter fließendem Wasser gründlich abspülen und darauf achten, dass sich die Schnitte nicht vom Objektträger lösen.	Bis Wasser möglichst klar.
3.	Mit Aqua dest. spülen.	Mehrmaliges Eintauchen.
4.	Mit Eosin überschichten.	6 Minuten
5.	In 95% igem Alkohol waschen.	Max. 2 mal!
6.	In 100% igem Alkohol waschen. (1. Bad)	Bis Objektträger klar ist.
7.	In 100% igem Alkohol waschen. (2. Bad)	Bis Objektträger klar ist.
8.	In Xylol eintauchen.	5 Minuten
9.	Eindeckeln in Entellan.	

#### 2.2.1.2. Herstellung immunhistologischer Präparate

##### a) Schneiden

Das mit Tissue-Tec Einbettmedium auf Metallhalter aufgeblickte Gewebe wurde zur weiteren Verarbeitung in einem Kryotom (Leica Kryostat CM3000, der Firma Leica Microsystems GmbH) in 10 µm dicke Schnitte geschnitten, welche dann auf beschichtete Objektträger der Marke Menzel – Super Frost aufgebracht wurden. Die Objektträger wurden vorher mit Silikon beschichtet (s.a. Anhang).

Objekttemperatur: -26°C

Kühltemperatur: -28°C

##### b) Fixieren



Nach dem Schneiden wurden die Schnitte entweder mit Aceton oder Methanol, bzw. einer Mischung aus diesen beiden Fixationsmitteln im Verhältnis 1:1 fixiert und anschließend an der Luft getrocknet. Eine weitere Möglichkeit der Fixierung bestand in der Formalinbehandlung. Die Präparate wurden in 4%igem Formalin 5 Minuten eingetaucht und anschließend ausführlich in PBS gewaschen. Die Wahl des Fixationsvorganges ist abhängig vom verwendeten Antikörper, da sie je nach Fixierung unterschiedlich starke Affinität zu ihren Bindungsstellen aufwiesen.

#### c) Färben

Vor dem Färben wurden die Präparate erst mit BSA-C + 5% Glycin, welches im Verhältnis 1:25 mit PBS verdünnt wurde, für 15 Minuten inkubiert. Dies hatte den Sinn, unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und somit die Hintergrundstrahlung nach der immunhistologischen Färbung zu reduzieren.

Jetzt konnte mit dem eigentlichen Färben der spezifischen Strukturen begonnen werden. Dazu wurden die histologischen Schnitte jeweils mit dem entsprechend verdünnten Antikörper überschichtet und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS – Lösung wurde mit dem 2., bzw. 3. Antikörper in gleicher Weise verfahren. Nach jedem Färbeschritt wurden die Objektträger mehrmals in PBS-Lösung gespült, um überschüssige Mengen Antikörper und Färbemittel zu entfernen.

#### d) Eindeckeln

Nach dem Färben wurden die histologischen Schnitte mit Deckgläsern der Firma Marienfeld und dem Einschließmedium Mowiol abgedeckt.

Das Vorgehen ist bei Einzel, bzw. Doppelfärbungen prinzipiell das gleiche Verfahren, in den nachfolgenden zwei Kapiteln ist jedoch noch einmal getrennt von einander die genaue Reihenfolge des Versuchsaufbaues aufgeführt, da bei den Doppelfärbungen einige Besonderheiten im Vergleich zu den Einfachfärbungen zu beachten sind.

##### **2.2.1.2.1. Einzel - Färbung**

Einfachfärbungen wurden zum einen durchgeführt, um die einzelnen 1. Antikörper auf ihre Wirksamkeit und Spezifität bei verschiedenen Verdünnungen und verschiedenen Fixierungen auszutesten. Zum anderen, um die Einzelstrukturen, besonders Connexin 40, 43 und 45, aber auch Pan Cadherin und Desmoplakin darzustellen, ohne von anderen Signalen überlagert zu sein. So konnten die weiter unten beschriebenen Intensitätsmessungen ohne Einfluss von Störfaktoren durchgeführt werden.

Um die Glanzstreifen möglichst in ihrer Ganzheit darzustellen, wurde eine Schnittdicke von 10 µm gewählt.

Als Kontrolle, ob die Färbung wirklich strukturspezifisch ist, fertigten wir bei jedem Färbedurchgang eine Negativkontrolle an. Das heißt, ein Präparat, das genauso behandelt wurde, wie alle anderen auch, bei dem aber der 1. Antikörper weggelassen und statt dessen PBS-Lösung aufgetragen wurde. So konnte festgestellt werden, ob das Nachweissystem unspezifische Bindungen eingeht, welche die Ergebnisse verfälschen würden.

Tabelle 3 Einzel-Färbung

Schritt	Material/Vorgehensweise	Zeit
1.	Fixierung: a) PFA 4% b) Aceton c) Methanol (Hier nach vorheriger Lufttrocknung 5 – 10 Minuten) d) Methanol – Aceton (1:1) Abhängig vom verwendeten Antikörper.	5 Minuten
2. nur bei 1 b) c) d)	Lufttrocknen	ca. 10 Minuten
3.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
4.	Überschichten mit BSA-C 5%+ Glycin	15 Minuten
5.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
6.	Nach gründlichem Trocknen 1. Antikörper auftragen, ca. 50 $\mu$ l / Schnitt, in der jeweiligen Verdünnung.	2 h – 24 h
7.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
8.	Nach gründlichem Trocknen 2. Antikörper auftragen, ca. 50 $\mu$ l / Schnitt, in der jeweiligen Verdünnung. a) Direkte Methode b) Indirekte Methode	1 - 2 h
9.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
10. nur bei 8 b)	Nach gründlichem Trocknen 3. Antikörper auftragen, ca. 50 $\mu$ l / Schnitt, in der jeweiligen Verdünnung.	1 – 2 h
11.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
12.	Kernfärbung oder $\alpha$ -Aktinin-Färbung, mit Propidiumjodid oder 33342 Hoechst, bzw. Phalloidin.	ca. 30 Minuten
13.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
14.	Eindeckeln mit Mowiol.	

Gründliches Trocknen bedeutete in diesem Fall nicht, dass wir die Schnitte austrockneten, sondern dass wir möglichst alle überschüssige PBS-Lösung vom Objektträger entfernten, um die Verdünnung des jeweiligen Antikörpers nicht zu verändern. Dies gilt auch für das nachfolgende Kapitel.

#### 2.2.1.2.2. Doppel - Färbung

Tabelle 4Doppel-Färbung

Schritt	Material/Vorgehensweise	Zeit
1. bis 5.	Sind exakt die gleichen Schritte, wie bei der Einzelfärbung!	
6.	Nach gründlichem Trocknen 1. Antikörper auftragen, ca. 50 µl / Schnitt, in der jeweiligen Verdünnung.	2 h – 24 h
7.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
8.	Nach gründlichem Trocknen 2. Antikörper auftragen, der gegen den 1. S-AK gerichtet ist, ca. 50 µl / Schnitt, in der jeweiligen Verdünnung. a) Direkte Methode b) Indirekte Methode	1 - 2 h
9.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
10. nur bei 8 b)	Nach gründlichem Trocknen 3. Antikörper auftragen, der gegen den 2. AK gerichtet ist, ca. 50 µl / Schnitt, in der jeweiligen Verdünnung.	1 – 2 h
11.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
12.	Nach gründlichem Trocknen 2. Antikörper auftragen, ca. 50 µl / Schnitt, in der jeweiligen Verdünnung.	2 h – 24 h
13.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
14.	Nach gründlichem Trocknen 2. Antikörper auftragen, der gegen den 2. S-AK gerichtet ist, ca. 50 µl / Schnitt, in der jeweiligen Verdünnung. a) Direkte Methode b) Indirekte Methode	1 – 2 h
15.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
16. nur bei 14 b)	Nach gründlichem Trocknen 3. Antikörper auftragen, der gegen den 2. AK gerichtet ist, ca. 50 µl / Schnitt, in der jeweiligen Verdünnung.	1 – 2 h
17.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
18.	Kernfärbung oder $\alpha$ - Aktinin – Färbung, mit Propidiumjodid oder 33342 Hoechst, bzw. Phalloidin.	ca. 30 Minuten
19.	Waschen in PBS	2 x 3 Minuten
20.	Eindeckeln mit Mowiol.	

Doppel – Färbungen haben wir durchgeführt, um die einzelnen Strukturen im Verhältnis zueinander darzustellen und um zu prüfen, ob die Antikörper Kreuzreaktionen eingehen, das heißt, dass zwei verschiedene Antikörper an die gleiche Struktur binden können. Die Wirksamkeit der Antikörper und deren Spezifität haben wir durch die Einzelmarkierungen, wie im vorangegangenen Kapitel dargelegt, nachgewiesen.

Es war darauf zu achten, dass die beiden 1. Antikörper nicht von der gleichen Spezies stammen, da sonst der jeweilige zweite und dritte Antikörper vollkommen unspezifisch alles markieren würde. Somit könnte nicht mehr zwischen den beiden verschiedenen Strukturen unterschieden werden.

Ähnliches gilt für die mit Fluoreszenz – Farbstoffen gekoppelten zweiten und dritten Antikörper. Hier musste darauf geachtet werden, dass nicht zwei rote oder grüne Farbstoffe verwendet werden.

Um die Glanzstreifen auch hier möglichst in ihrer Ganzheit darzustellen, wurde ebenfalls eine Schnittdicke von 10 µm gewählt.

Es besteht die Möglichkeit, die beiden 1. Antikörper gemeinsam aufzutragen und bei zweitem und drittem Antikörper genauso zu verfahren, um die Zeit abzukürzen, bis ein Durchgang abgeschlossen ist. Dies hat sich jedoch nicht bei allen Kombinationen bewährt, da sich die Antikörper gegenseitig von ihrer Andockstelle verdrängen können, wenn die Strukturen, die sie markieren sollen, räumlich sehr nahe bei einander liegen. Dies ist zum Beispiel bei Connexin 40 und Connexin 43 in atrialem Gewebe der Fall.

### **2.2.2 Standardisierung der Färbetechnik**

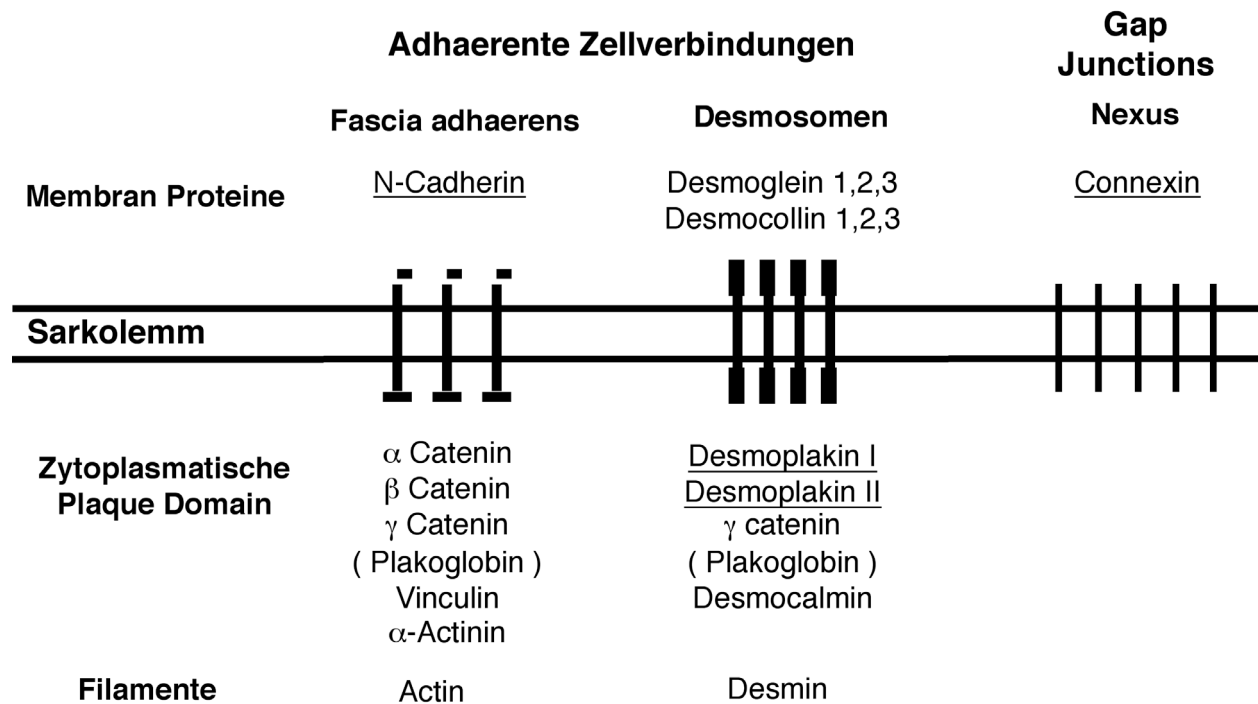
Um zu gewährleisten, dass nicht durch Unterschiede in der Herstellung, z.B. Raumtemperatur, Verdünnung der Antikörper, oder aber durch unterschiedliche Lagerungszeiten vor oder nach dem Färben, die Vergleichbarkeit der einzelnen histologischen Schnitte leiden würde, haben wir alle Schnitte und Färbungen, die wir für die Messungen benötigten, zeitgleich durchgeführt. Somit konnten wir sicher gehen, dass alle Präparate unter standardisierten Bedingungen angefertigt wurden.

### **2.2.3. Antikörper**

Nachfolgend sind die verwendeten Antikörper aufgeführt.

### 2.2.3.1. 1. Antikörper

In Tabelle 5 sind die Antikörper gegen die Glanzstreifenproteine des Herzens aufgeführt, während in Tabelle 6 entsprechend die Antikörper gegen anderweitige Strukturen des Herzmuskelgewebes aufgelistet sind. Schema 1 zeigt eine schon früher veröffentlichte Darstellung des Glanzstreifenaufbaus und der dazu gehörigen Glanzstreifenproteine. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr.med. Sawa Kostin)<sup>62</sup>.



Schema 1

Tabelle 5 Antikörper gegen Glanzstreifenproteine

Name / Firma	Bindungsort	Verdünnung	Clone #	Art
Connexin 40 / CHEMICON	Gap Junctions	1:10	-	polyklonal
Connexin 43 / BIO TREND	Gap Junctions	1:500 – 1000	4E6.2	monoklonal
Connexin 43 / ZYMED	Gap Junctions	1:100	-	polyklonal
Connexin 45 / CHEMICON	Gap Junctions	1:15	8A11.2	monoklonal
Connexin 45 / Dr. Severs	Gap Junctions	1:200	-	polyklonal
Desmoplakin / BOEHRINGER	Desmosomen	1:5	DP1&2-2.15	monoklonal
Desmoplakin / NatuTec	Desmosomen	1:10	-	polyklonal
N Cadherin / SIGMA	Fascia Adhaerens	1:200	CH-19	monoklonal
N Cadherin / SIGMA	Fascia Adhaerens	1:500	-	polyklonal
A-Cam / SIGMA	Fascia Adhaerens	1:100	GC-4	monoklonal

Tabelle 6 Antikörper gegen Proteine von Kardiomyozyten

Name / Firma	Bindungsort	Verdünnung	Clone #	Art
$\alpha$ -Aktinin / SIGMA	Myofibrillen	1:200	EA-53	monoklonal
CD 3 / DAKO	CD 3 Molekül	1:25	T3-4B5	monoklonal
CD 4 / DAKO	CD 4 Molekül	1:25	MT310	monoklonal
CD 8 / DAKO	CD 8 Molekül	1:25	DK25	monoklonal
Collagen I / SIGMA	Kollagen Typ I	1:50	COL-1	monoklonal
Collagen III / SIGMA	Kollagen Typ III	1:100	-	polyklonal
Collagen VI / ROCKLAND	Kollagen Typ VI	1:100	-	polyklonal
Dystrophin / SIGMA	Zellmembran	1:40	MANDYS8	monoklonal
Laminin / IMMUNOTECH	Basalmembran	1:20	-	polyklonal
Myomesin / von Dr. Eppenberger	Myofibrillen	1:5	B4	monoklonal

### 2.2.3.2. 2. Antikörper

Tabelle 72. Antikörper

Name / Firma	Direkt	Indirekt	Verdünnung	Farbe
Biotin donkey anti mouse / DIANOVA	-	X	1:100	-
FITC anti rabbit IgG / BIO TREND	X	-	1:50	Grün
Donkey anti rabbit CY3 / CHEMICON	X	-	1:100	Rot
Rhodamine TRITC anti mouse / BIO TREND	X	-	1:50	Rot

Die zweiten Antikörper können sowohl direkt, als auch indirekt arbeiten. Direkt heißt, dass der Antikörper fest mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, also kein weiterer Färbeschritt notwendig ist.

Indirekt bedeutet, dass der zweite Antikörper gegen den ersten gerichtet ist, jedoch noch nicht mit einem Farbstoff gekoppelt ist, so dass noch ein weiterer Schritt mit einem dritten Antikörper oder Fluoreszenzfarbstoff notwendig ist. Dieser bindet dann an den zweiten Antikörper.

### 2.2.3.3. 3. Antikörper

Tabelle 83. Antikörper

Name / Firma	Direkt	Indirekt	Verdünnung	Farbe/Spektrum
CY2-Streptavidine / ROCKLAND	-	X	1:100	Grün/489

#### 2.2.3.4. Sonstige Farbstoffe

Sonstige Farbstoffe verwendeten wir, um die Kerne, bzw.  $\alpha$  - Aktinin darzustellen. Sie binden direkt an die entsprechenden Strukturen und sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt.

Tabelle 9 Sonstige Farbstoffe

Name / Firma	Angriffsort	Verdünnung	Farbe/Spektrum
33342 Hoechst / HOECHST	Kerne	1:1000	Blau/346
TRITC Phalloidin / SIGMA	$\alpha$ - Aktinin	1:250	Rot/554
Propidiumjodid / SIGMA	Kerne	1:100	Rot/536
7AAD	Kerne		Rot/560
TOTO-3	Kerne		Blau/660

#### 2.2.4. Aufbewahrung der Präparate

Die fertigen Präparate haben wir, in Aluminiumfolie einzeln eingewickelt, im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Bei dieser Temperatur kommt es nicht zu morphologischen Veränderungen, die nachträglich die Ergebnisse verfälschen würden. Des Weiteren wurde durch das Einwickeln in Aluminiumfolie verhindert, dass die Fluoreszenzfärbung durch Lichteinstrahlung an Intensität verliert.

### 2.3. Lichtmikroskopie

Um die Ausrichtung des Gewebes, also Längs-, Quer- oder Tangentialschnitt, vor der immunhistologischen Untersuchung zu bestimmen, fertigten wir, wie weiter oben schon ausgeführt, Hämatoxylin - Eosin - Präparate an. Diese untersuchten wir mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Leica DM - RB) unter Durchlicht.

Verwendete Objektive:

1. PL Fluotar 25x / 0,75 OIL, von Leica Germany.
2. PL Fluotar 40x / 1,00 - 0,50 OIL, von Leica Germany.
3. PL APO 63x / 1,40 OIL, von Leica Germany.

## 2.4. Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie können immunhistologisch markierte Strukturen sichtbar gemacht werden. Fluoreszierende Farbstoffe, die an Antikörper gebunden sind, werden mit Licht einer speziellen Wellenlänge (z.B. Laserlicht oder Quecksilber-Dampf-Lampe) zum Leuchten angeregt.

Die so präparierten histologischen Schnitte können dann mit einem speziellen Fluoreszenzmikroskop in Auflichttechnik untersucht werden (Leica DM - RB). Hierbei wird die Strahlung einer 100 Watt Quecksilber-Dampf-Lampe durch Filter spezifischer Wellenlängenbereiche von oben auf das Präparat geleitet. Durch das Zwischenschalten von Filtern verschiedener Wellenlängenbereiche konnten wir die mit unterschiedlichen Antikörpern markierten Strukturen sichtbar machen.

Mit einem konfokalen Lasermikroskop ist es möglich, die gewonnenen Bilder digital zu verarbeiten und zu speichern (Leica TCS SP). Im Gegensatz zum normalen Fluoreszenzmikroskop wird hier das Strahlenbündel einer Laserlampe nicht durch Filter geleitet, sondern erst in einem Prisma aufgetrennt und dann durch eine Blende der Wellenlängenbereich eingegrenzt.

Bei dem uns zur Verfügung stehenden konfokalen Mikroskop ist es möglich, schon im Vorfeld durch die Wahl des Lasers das Lichtspektrum einzuschränken. Es besteht die Möglichkeit, zwischen einem Argon-, einem Krypton- bzw. einem Helium-Neon-Laser zu wählen. Die Hauptspektren der Laser teilen sich wie folgt auf:

Krypton	=>	488 nm
Argon	=>	458 nm
Helium-Neon	=>	568 - 633 nm

Die Objektive, die wir verwendeten, sind in beiden Fällen die gleichen, da der Grundaufbau des optischen Apparates der Mikroskope identisch ist. Wir benutzten:

1. HC PL APO 20x / 0,70 IMM CORR, von Leica Germany.
2. HCX PL APO 40x / 1,25 - 0,75 OIL, von Leica Germany.
3. HCX PL APO 63x / 1,32 - 0,6 OIL, von Leica Germany.

In der nachfolgenden Tabelle sind die von uns verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zusammen mit der Wellenlänge ihres Anregungsbereiches aufgeführt.



Tabelle 10 Anregungsbereich der verwendeten Antikörper

<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Wellenlänge in nm des Anregungsbereiches</b>
FITC	494
TRITC	554
CY 2	489
CY 3	550
CY 5	650
Hoechst 33342	346
Propidiumjodid	536
7AAD	560
TOTO-3	660

#### **2.4.1. Herstellung von Bildern zur Beurteilung der Morphologie**

Verwendung fand ein konfokales Lasermikroskop der Firma Leica (Model TCS SP) mit der entsprechenden Software (Leica TCS NT Version 1.6.587). Die hier erstellten Bilderserien wurden in digitaler Form gespeichert und im Anschluss daran an einer Imaris Workstation der Firma Silikon Graphics weiterverarbeitet, um eine klarere Darstellung der immunhistologisch markierten Strukturen zu erhalten, indem beispielsweise die Hintergrundstrahlung reduziert wurde.

#### **2.4.2. Herstellung von Bildern zur Quantifizierung**

Um die Fluoreszenzintensität als Maß für die Menge an Protein messen zu können, mussten Bilder der zu messenden Strukturen angefertigt werden. Hierbei wurde ein konfokales Lasermikroskop der Firma Leica verwendet (Model TCS SP) mit der entsprechenden Software (Leica TCS NT Version 1.6.587). Mit diesem Mikroskop bzw. der Software ist es möglich, unter standardisierten Einstellungen Schichtaufnahmen des Gewebes zu speichern, welche dann später weiterverarbeitet werden können. Mit diesem Programm ist es auch möglich, die Fluoreszenzintensität bestimmter Strukturen bzw. einzelner Bereiche des Bildes getrennt nach den einzelnen Farbkanälen zu bestimmen.

Um die Grundeinstellungen zum Scannen der Präparate für die Messungen zu definieren, verwendeten wir den Glow over–Glow under–Modus. Hierbei konnten wir erkennen, ob das Bild überstrahlt oder zu schwach in seiner Fluoreszenz ist und somit die Grenzen der Intensitätsskala von 0 – 255 überschreiten würde, denn Bildpunkte, die heller oder dunkler als der erfassbare

Bereich sind, werden jeweils bei 0 bzw. 255 akkumuliert und sind somit Störgrößen bei der Berechnung der wahren Fluoreszenzintensität. Alle Präparate wurden zur Probe gescannt, um eine Einstellung zu bestimmen, unter der alle Messungen der Fluoreszenzintensität in diesem Bereich lagen. Dabei müssen Laserstärke, Frequenzbereich des Filters (entsprechend dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff), Schichtdicke der Scanschichten, Dicke des Präparates und die allgemeine Fluoreszenzintensität des verwendeten Farbstoffes berücksichtigt werden.

Da wir Schnitte der Dicke 10  $\mu\text{m}$  verwendeten, wählten wir einen Bereich von 3  $\mu\text{m}$  im Inneren des Gewebeblocks, den wir in 6 Schichten à 0,5  $\mu\text{m}$  scannten. Diese sechs Bilder fügte der Computer dann im Projektions-Modus zu einem zweidimensionalen Bild zusammen. Dabei errechnet er das neue Bild, indem er von den sechs Bildpunkten, die vertikal übereinander liegen, den hellsten für das neue Bild verwendet. So bekamen wir ein klares Bild in einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel mit relativ wenig Hintergrundstrahlung.

Die Rohdaten der so erhaltenen Bilder speicherten wir als Scanner-Files ab. Diese Files beinhalten Bildgröße, Auflösung, Vergrößerung, verwendetes Objektiv, Lasereinstellungen, Filtereinstellungen und Offset-Einstellungen, sowie die Daten der sechs Bilder selbst.

#### **2.4.3. Speicherung der Daten**

Die gewonnenen Daten wurden von uns zur längerfristigen Sicherung auf CD - ROM gespeichert, sowohl die Rohdaten der Bilderserien, als auch die Ergebnisse der Messungen.

#### **2.4.4. Standardisierung von Bildaufnahme und Messung**

Um zu verhindern, dass durch längere Lagerung der angefertigten Präparate die Qualität der Färbung sich verändern würde und somit die einzelnen Messungen der Intensität nicht mehr vergleichbar sein würden, stellten wir die oben beschriebenen Bilderserien in einem sehr kurzen Zeitraum her, nachdem die Präparate fertig gestellt waren. Wir achteten sehr genau darauf, dass die Einstellungen am Mikroskop, der Software, den Filtern und an den drei Lasereinheiten bei allen angefertigten Bildern exakt übereinstimmten.

Die darauf folgenden Messungen der Leuchtintensität der markierten Gap Junctions und der Fläche der Gap Junctions pro Zelle wurden an diesen gespeicherten Bilderserien durchgeführt. Die nun digitalisierten Bilder wurden von uns keiner weiteren Nachbearbeitung unterzogen.

## 2.5. Messung der Fluoreszenzintensität

### 2.5.1. Durchschnittsintensität pro Glanzstreifen

Die Messungen der Fluoreszenzintensität wurden mit dem Quantify Modus der Software von Leica (TCS NT, Version 1.6.587) durchgeführt. Hierbei misst das Programm die Helligkeit der einzelnen Bildpunkte auf einer Skala von 0 bis 255. Dies entspricht einer Grauwerteskala. Durch die von uns vorgenommenen Grundeinstellungen lagen alle Messungen in diesem Bereich.

Formel 1

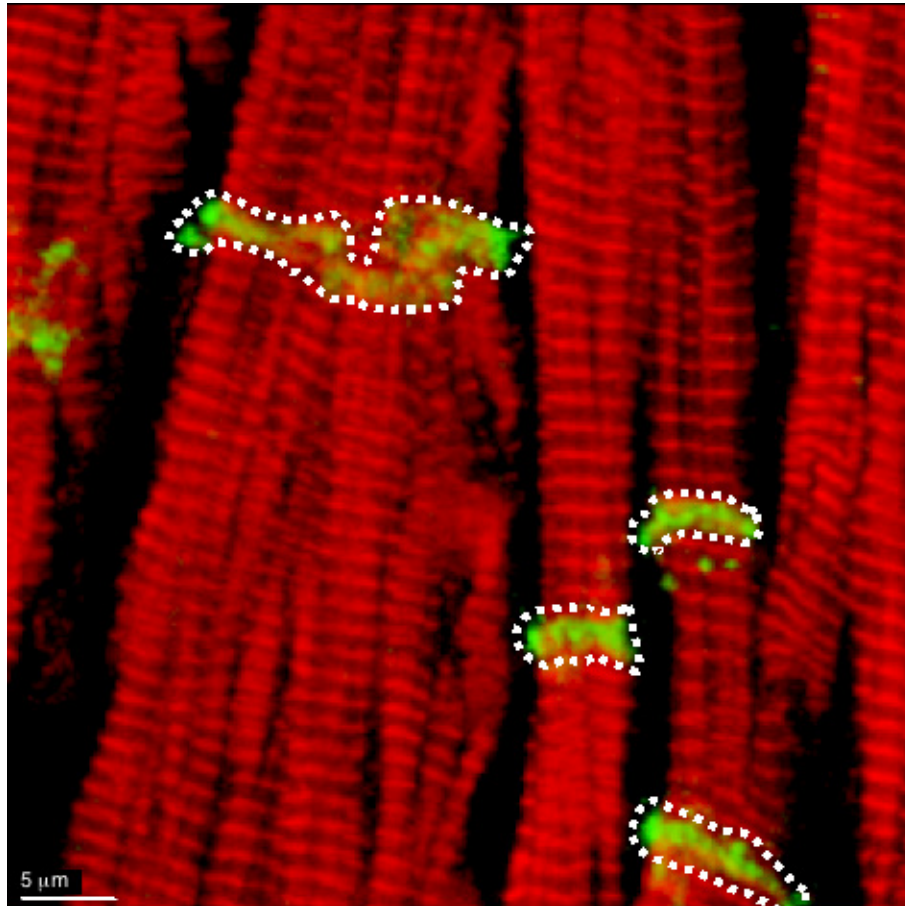
#### Fluoreszenzintensität pro Glanzstreifen

$$\frac{\sum_{i=0}^{255} ((i + 1) \times BP_i)}{\sum_{i=0}^{255} BP_i} = AU$$

i = Intensitätsstufe  
BP = Anzahl der Bildpunkte

Die in Formel 1 dargestellte Formel erklärt die Berechnung der Fluoreszenzintensität pro Glanzstreifen. Da es für die Fluoreszenzintensität keine Maßeinheit gibt, erhoben wir die Ergebnisse in Arbitrary Units (AU). Dies ist eine Einheit, die verwendet werden kann, wenn es für den zu bestimmenden Parameter keine einheitliche Messgröße gibt. Die Nutzung von Arbitrary Units war möglich, da wir die Messung der Fluoreszenzintensität unter standardisierten Bedingungen durchgeführt hatten.

Die zu messenden Glanzstreifen haben wir mit dem Cursor markiert und so die Intensität pro Glanzstreifen gemessen. Die Gesamtintensität errechnet sich dann aus der Summe der Intensitätsstufen, jeweils multipliziert mit der Anzahl der Bildpunkte dieser Intensität. Das Programm bezieht dann die Gesamtintensität auf die Anzahl der umfahrenen Bildpunkte, so dass wir eine Durchschnittsintensität für einen Glanzstreifen bekamen, mit entsprechender Standardabweichung und der dazugehörigen Flächenangabe. Ähnliche Methoden wurden auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet<sup>34,60,63,64</sup>.

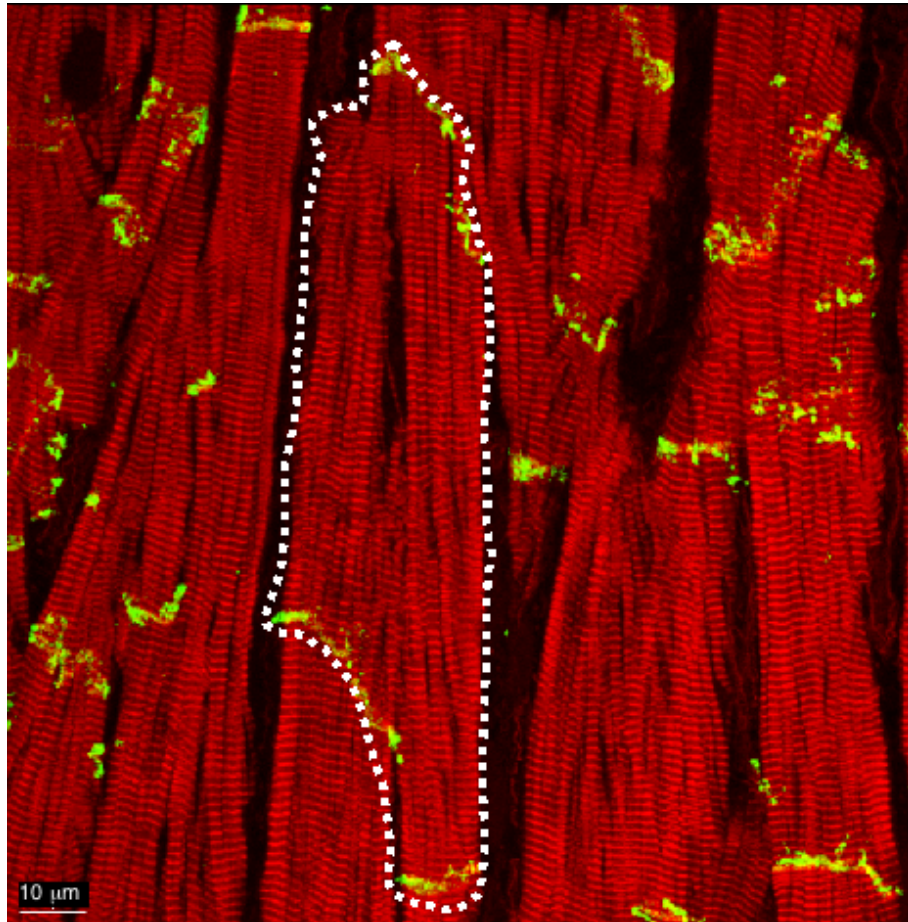


*Abb. 1: Diese Abbildung zeigt, wie die Fluoreszenzintensität pro Glanzstreifen gemessen wurde. Jeder einzelne dieser vier hier zu sehenden Glanzstreifen wurde isoliert gemessen. Die weiß gestrichelte Linie begrenzt exakt den Messbereich, so dass Störgrößen minimiert werden konnten. (In Rot  $\alpha$ -Aktinin, in Grün Connexin 43).*

Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität eines Glanzstreifens dient als Maß, welche Menge an Fluoreszenzfarbstoff sich durch Antigen-Antikörper-Reaktion an Protein gebunden vorliegt, da dies von der Menge des interessierenden direkt abhängig ist. Dieser Wert korreliert folglich sehr hoch mit der Menge des zu bestimmenden Proteins und macht somit die einzelnen Messungen vergleichbar.

### **2.5.2. Fläche und Dichte der Gap Junctions pro Zellfläche**

Um die Gap Junctionfläche bzw. -dichte pro Zellfläche angeben zu können, bedurfte es einiger Änderungen des Messvorganges. Wir wählten den Weg, eine longitudinal geschnittene Zelle als Ganzes zu markieren und dann die Anzahl der positiven Pixel als Summe zu bestimmen, um diese dann auf die Zellfläche (Summe aller in der umfahrenen Fläche enthaltenen Pixel) zu beziehen. Da jedoch die Hintergrundstrahlung nicht ganz zu eliminieren war und somit die Gesamtsumme der Intensitäten von der Größe der Zelle abhängig war, haben wir uns dazu entschieden, diese Hintergrundstrahlung rechnerisch zu eliminieren.



*Abb. 2: Diese Abbildung legt dar, wie der Messbereich für eine komplette Zelle definiert wurde. Die dunkle Aussparung in der Mitte der markierten Zelle entspricht dem Zellkern, der mit der hier verwendeten Färbung nicht zu erkennen ist. Da der Zellkern von Herzmuskelzellen zentral in ihrem Inneren liegt, nahmen wir dies als Anhaltspunkt dafür, ob eine Zelle als Ganzes dargestellt ist, oder ob nur ein Ausschnitt zu erkennen war. (In Rot  $\alpha$ -Aktinin, in Grün Connexin 43). Die weiß gestrichelte Linie stellt wiederum den Messbereich dar.*

In mehreren Versuchsreihen testeten wir, wo die Grenze zwischen Hintergrundmarkierung und positiver Markierung des Connexin 43 lag. Hierbei wurden von uns sowohl die ganzen Zellen, als auch die einzelnen Glanzstreifen gemessen und danach die Summe der Einzelmessungen mit der Gesamtsumme der ganzen Zelle verglichen. Wir fanden diese Grenze bei Intensitätsstufe 50. Folglich berechneten wir die neue Gesamtsumme der Intensitäten pro Zelle nur noch von Stufe 50 bis 255. Den Bereich von 0 bis 50 sahen wir als negative Markierung an.

Formel 2

Fluoreszenzintensität pro Zelle

$$\frac{\sum_{i=50}^{255} ((i+1) \times BP_i)}{\sum_{i=0}^{255} BP_i} = AU$$

i = Intensitätsstufe  
BP = Anzahl der Bildpunkte

Formel 2 beschreibt die Berechnung der Fluoreszenzintensität pro Zelle. Im Grunde entspricht dieser Term der Berechnung der Fluoreszenzintensität pro Glanzstreifen. Wir mussten jedoch aufgrund der Hintergrundstrahlung des Zellsomas den Bereich der positiven Markierung genauer definieren. Deshalb beginnt die Berechnung der Fluoreszenzintensität der Bildpunkte erst bei Intensitätsstufe 50. Da wir diesen Wert jedoch pro Zelle angeben wollten, mussten wir die Anzahl aller Bildpunkte pro Zelle berücksichtigen, also von 0 bis 255. Auch für diese Messungen verwendeten wir Arbitrary Units (AU) als Maßeinheit.

Die Fläche der Gap Junctions pro Zellfläche berechneten wir anhand der Pixelgröße. Die Summe der positiv markierten Bildpunkte multipliziert mit der Größe eines Bildpunktes entspricht der durch Gap Junctions eingenommenen Fläche pro Zelle.

Die Summe aller im Messbereich vorhandenen Bildpunkte multipliziert mit der Pixelgröße wiederum ergibt die Zellfläche insgesamt.

Formel 3

Gap Junctionfläche pro Zellfläche

$$\frac{\sum_{i=50}^{255} (BP_i \times BPG)}{\sum_{i=0}^{255} (BP_i \times BPG)} = \frac{\mu m^2}{\mu m^2}$$

i = Intensitätsstufe  
BP = Anzahl der Bildpunkte  
BPG = Bildpunktgröße

Formel 3 stellt die Berechnung der Gap Junctionfläche pro Zellfläche dar. Auch hier berücksichtigten wir die Hintergrundstrahlung des Zellsomas, indem wir nur Bildpunkte mit

einer Intensitätsstufe  $\geq 50$  als positiv markiert ansahen. Die Intensitätsstufe diente lediglich der Definition des positiven Bereichs und wurde nicht in die Berechnung mit einbezogen.

Somit ließ sich die Fläche der Gap Junctions sowohl pro Zelle, als auch pro Zellfläche berechnen.

### 2.5.3. Gap Junctionfläche pro Zellvolumen

Um die Fläche der Gap Junctions pro Zellvolumen zu berechnen, wurde der Wert für die Fläche der Gap Junctions pro Zellfläche durch das Zellvolumen dividiert. Das Zellvolumen konnten wir anhand des dreidimensionalen Abbildes der Zelle bestimmen, da die Rohdaten der von uns angefertigten Bilder, ähnlich einem computertomographischen Bild eines Körpers, eine räumliche Rekonstruktion der Zelle erlauben.

Formel 4

$$\frac{\sum_{i=50}^{255} (BP_i \times BPG)}{\sum_{i=0}^{255} (BP_i \times BPG \times SD)} = \frac{\mu m^2}{\mu m^3}$$

$i$  = Intensitätsstufe  
 $BP$  = Anzahl der Bildpunkte  
 $BPG$  = Bildpunktgröße  
 $SD$  = Schichtdicke des Scannbereiches

Bei dem in Formel 4 aufgeführten Term zur Berechnung der Gap Junctionfläche pro Zellvolumen handelt es sich um eine Erweiterung des in Formel 3 erläuterten Terms. Da wir das Gewebe in einer Schichtdicke von  $3 \mu m$  in  $0,5 \mu m$ -Schritten gescannt hatten, konnten wir die positiv markierten Bildpunkte auch pro Zellvolumen berechnen.

### 2.5.4. Korrelation von Gap Junctionfläche und Zellgröße

Um einen Zusammenhang zwischen Gap Junctionfläche und Zellgröße zu bestimmen, verglichen wir die jeweils gemessene Fläche der Gap Junctions pro Zelle mit der dazugehörigen Zellgröße. Das Ergebnis wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

## **2.6 Statistische Auswertung**

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe eines ANOVA-Tests, gefolgt von einem Test nach Bonferroni auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht.

## **2.7. Elektronenmikroskopie**

Die hier gezeigten transmissionselektronenmikroskopischen Bilder wurden freundlicherweise von Dr. Sawa Kostin zur Verfügung gestellt. Sie wurden nach dem gleich Verfahren hergestellt, welches von ihm schon in früheren Publikationen ausführlich beschrieben wurde <sup>39,62,65,66</sup>. Sie dienen der Vervollständigung der in dieser Studie veröffentlichten Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen der Glanzstreifen bei chronisch erkranktem Myokard des Menschen.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ergebnis der morphologischen Untersuchungen der Zell-Zellkontakte

##### 3.1.1. Kontrollgewebe

Die Connexin 43 Gap Junctions in gesundem Ventrikelgewebe befinden sich im Bereich der Glanzstreifen des Arbeitsmyokards. Dies ist besonders eindrucksvoll an longitudinal geschnittenem Herzmuskelgewebe zu erkennen. Die räumliche Verteilung der Gap Junctions auf einem Querschnitt erscheint ähnlich einem Ring, Dichte und Größe der Zellkontakte nehmen von zentral nach peripher zu.

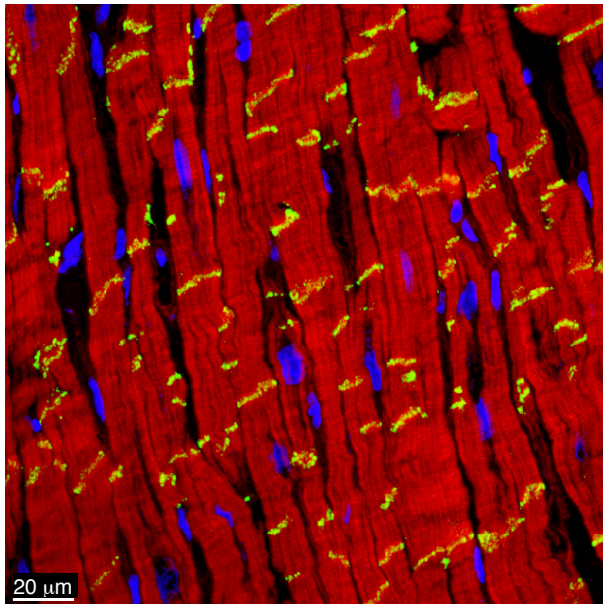


Abbildung 3

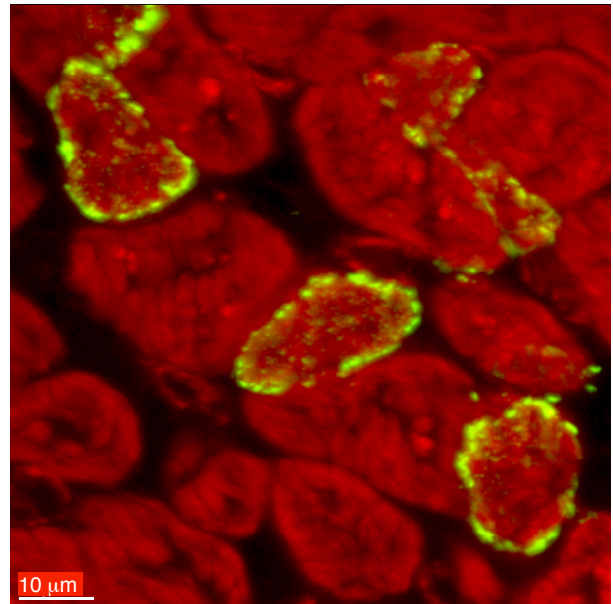
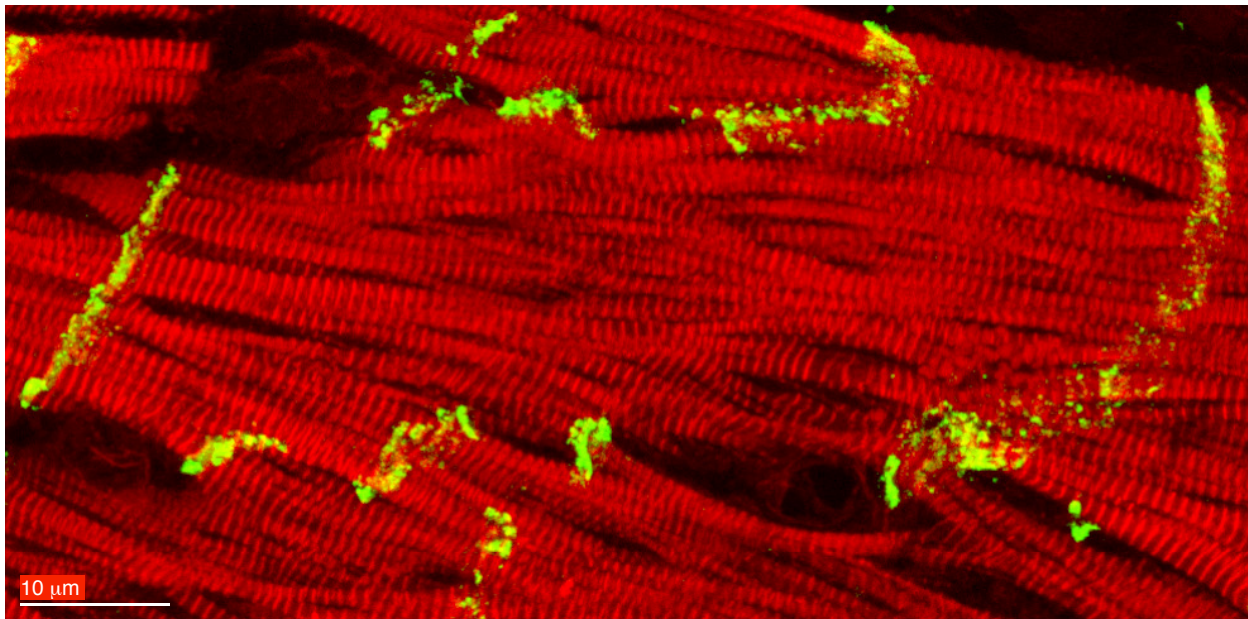


Abbildung 4

Abb. 3: Das Bild zeigt eine dreifache Färbung für Connexin 43 (grün), F-Aktin (rot) und eine Kernfärbung mit TOTO-3 (blau) an longitudinal geschnittenem Kontrollgewebe. Es ist deutlich zu sehen, dass sich die Gap Junctions im Bereich des Glanzstreifens befinden, und dass das laterale Sarkolemm von Gap Junctions frei bleibt.

Abb. 4: Hier ist auf einem Transversalschnitt des gleichen Kontrollgewebes die räumliche Verteilung der Gap Junctions zu sehen. Ähnlich einem Ring lagern sich große Gap Junctions in der Peripherie des Glanzstreifens an, während zentral lediglich kleine Gap Junctions zu finden sind. (Connexin 43 in grün, F-Aktin rot)



*Abb. 5: Diese Abbildung zeigt, wie viele Glanzstreifen eine gesunde Herzmuskelzelle ausbilden kann. In Grün ist Connexin 43 dargestellt, in Rot  $\alpha$ -Aktinin.*

Connexin 40 Gap Junctions sind sowohl in den Glanzstreifen der Purkinje-Fasern, als auch in der Lamina muskularis der arteriellen Gefäße zu finden. Das Arbeitsmyokard ist weitgehend frei von Connexin 40 Gap Junctions. Es war uns nicht möglich, einen erhöhten Gehalt an Connexin 40 im Arbeitsmyokard des erkrankten Herzens nachzuweisen. Lediglich die schon erwähnten Purkinje-Fasern ließen sich für Connexin 40 positiv anfärben (Abb. 6,7).

Die dritte, am Herzmuskel vorkommende Connexinisoform, das Connexin 45, lässt sich nur in sehr kleiner Menge sowohl im Atrium, als auch im Ventrikel nachweisen. Wobei nicht sicher zu klären war, ob der uns zur Verfügung stehende Antikörper selektiv an Connexin 45 Gap Junctions bindet oder Kreuzreaktionen mit anderen Connexinisoformen eingeht.

Desmoplakin, als Bestandteil der Desmosomen, stellt sich immunhistologisch sowohl als Bestandteil der Glanzstreifen, als auch des glanzstreifennahen lateralen Sarkolemms dar. Die räumliche Verteilung dieser Zell-Zell-Verbindungen ist nicht ganz so strikten Regeln unterworfen, wie dies bei den Gap Junctions der Fall ist. Sie dienen der mechanischen Integration der Einzelzelle in den Zellverband und haben keinerlei Einfluss auf die Erregungsleitung des Myokards.

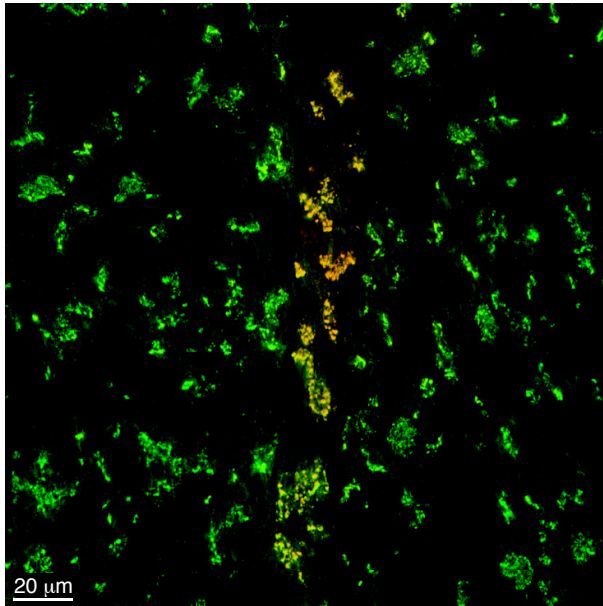


Abbildung 6

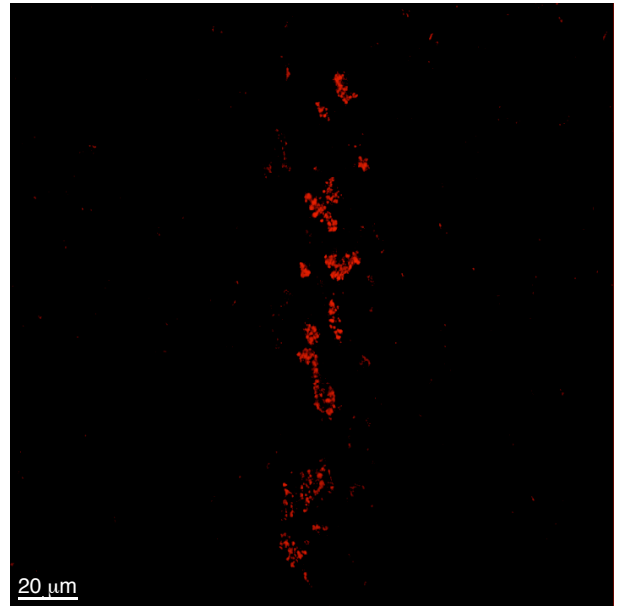


Abbildung 7

Abb. 6: Hier ist eine Doppelfärbung für Connexin 43 (grün) und Connexin 40 (orangerot) dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass sich Connexin 40 lediglich in einem kleinen Bereich nachweisen lässt.

Abb. 7: Dieses Bild entspricht Abb. 6, jedoch wurde selektiv der grüne Kanal ausgeblendet. Somit ist hier lediglich eine Muskelfaser zu sehen, die durch Connexin 40 Gap Junctions verbunden wird. Diese Faser gehört zum spezialisierten Erregungsleitungssystem, den Purkinje-Fasern.

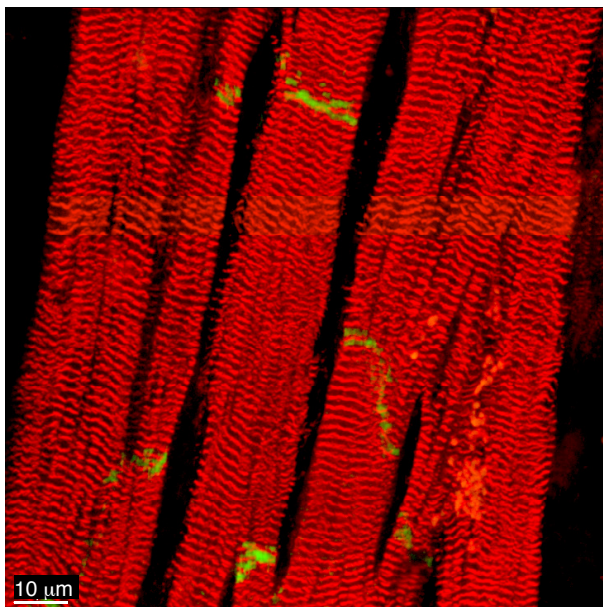


Abbildung 8

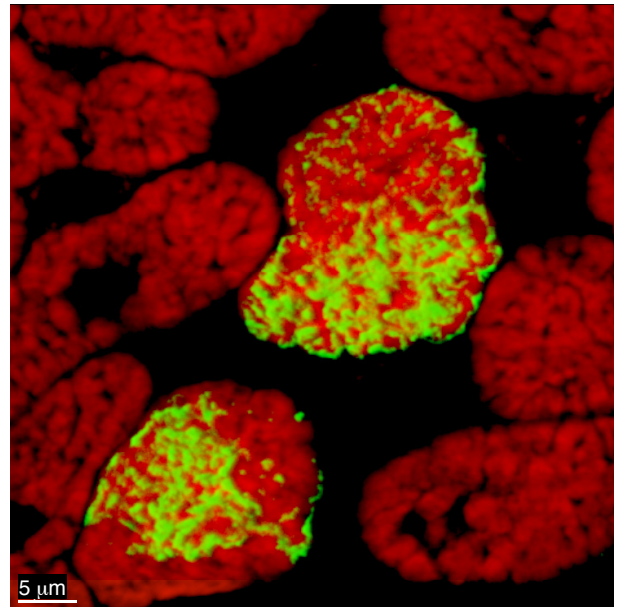


Abbildung 9

Abb. 8: Dieses Bild zeigt einen longitudinal geschnittenen Ausschnitt des Kontrollgewebes, der für Desmoplakin (grün) und Myomesin (rot) gefärbt wurde.

Abb. 9: Auf diesem Bild ist ein transversal geschnittener Abschnitt zu sehen, der für Desmoplakin (grün) und F-Aktin gefärbt wurde. Deutlich zu sehen ist die gleichmäßige Verteilung der Desmosomen über den kompletten Glanzstreifen.



Gleiches wie für Desmoplakin gilt auch für Cadherin, welches Bestandteil der Fascia Adhaerens ist.

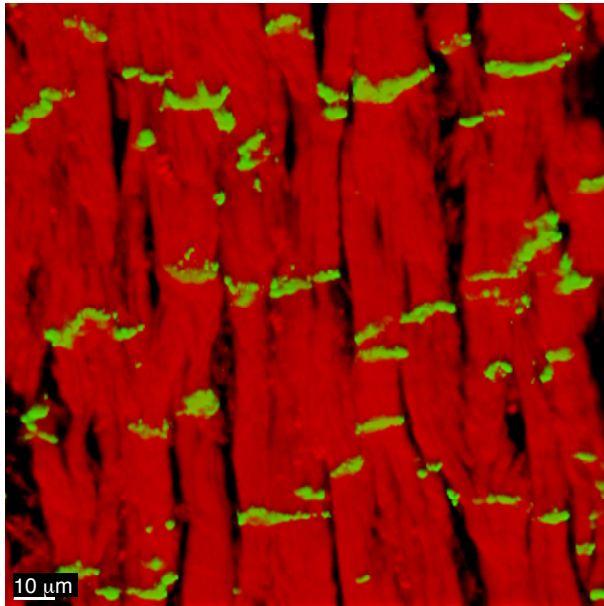


Abbildung 10

Abb. 10: N-Cadherin (grün) und F-Aktin (rot) im Longitudinalschnitt.

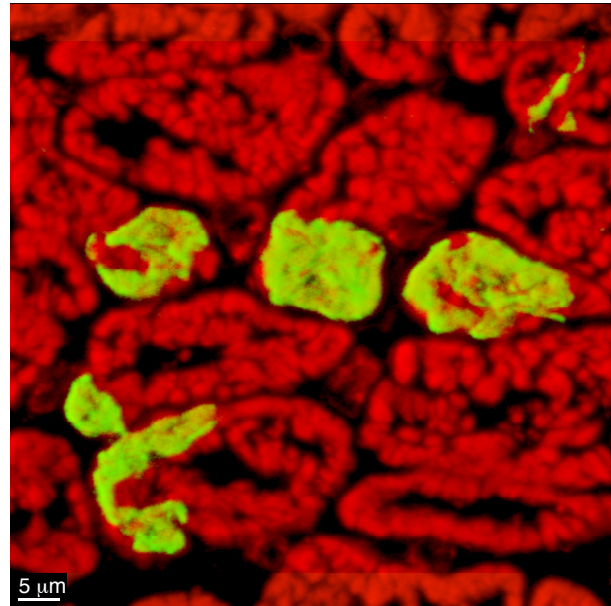


Abbildung 11

Abb. 11: N-Cadherin (grün) und F-Aktin (rot) im Transversalschnitt.

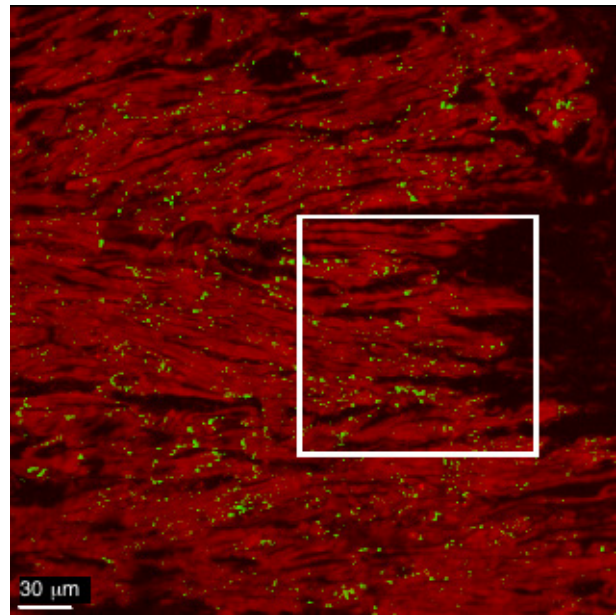
### 3.1.2. Pathologisch verändertes Gewebe

Bei allen untersuchten krankhaft veränderten Herzen waren die Connexin 43 Gap Junctions in den Bereichen der pathologischen Veränderungen unregelmäßig verteilt. Das an den Glanzstreifen lateral anschließende Sarkolemm, welches bei gesunden Herzen frei von Gap Junctions ist, zeigt ein deutlich positives Signal für die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörper.

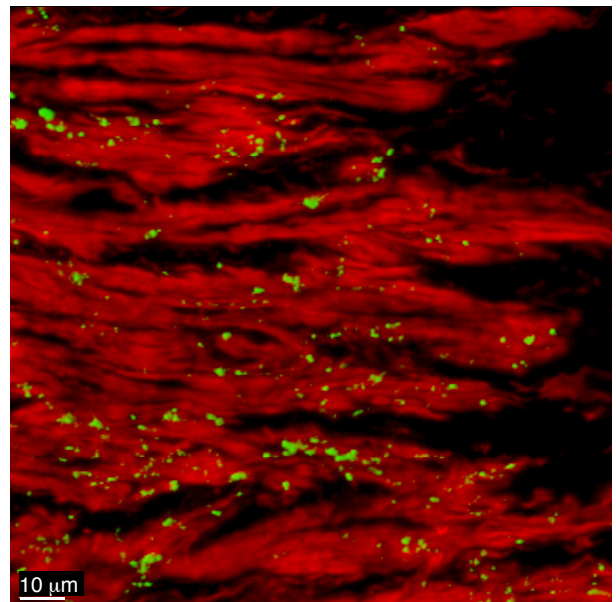
#### 3.1.2.1 Ischämische Kardiomyopathie

Besonders betroffen bei ischämischer Kardiomyopathie ist das Gebiet in der Nähe von abgeheilten Infarktzone, der so genannten „border zone“. Zellen, die direkt an die Infarktnarbe angrenzen, bilden auf der dem Infarkt zugewandten Seite keinen klar definierten Glanzstreifen mehr aus. Die Zell-Zell-Verbindungen sind völlig unregelmäßig über das laterale und apikale Sarkolemm verteilt.

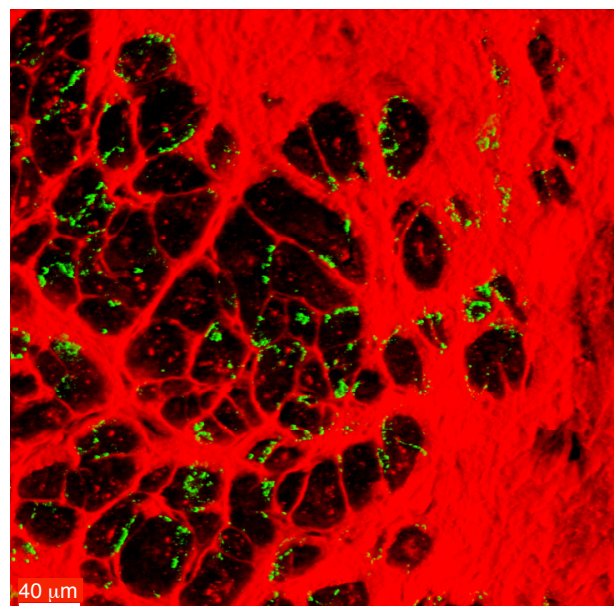
*Abb. 12: Auf diesem Bild ist der Bereich der Border Zone zu erkennen. Grün ist Connexin 43 und rot F-Aktin gefärbt. Der ungefärbte Abschnitt auf der rechten Seite entspricht der Infarktnarbe, die in Abb. 14 durch die spezielle Färbung für Kollagen VI besser zu erkennen ist. Deutlich zu sehen ist die chaotische Verteilung der Connexin 43 Gap Junctions in diesem Areal.*



*Abb. 13: Zeigt in einer höheren Auflösung den in Abb. 12 weiß markierten Ausschnitt, der die direkt an die Infarktnarbe angrenzenden Myozyten enthält. Es ist zu erkennen, dass hier keine eindeutig identifizierbaren Glanzstreifen vorhanden sind.*



*Abb. 14: Zeigt transversal geschnittene Myozyten, die in die Infarktnarbe hineinreichen und dort über die grün gefärbten Connexin 43 Gap Junctions zu weiteren Myozyten Kontakt halten. Das Kollagen VI des Narbengewebes ist rot gefärbt.*



Auch Desmosomen und Fascia Adhaerens sind von diesem Prozess betroffen. Die überlebenden Kardiomyozyten in der „boarder zone“ bilden zwar noch alle Zell-Zell-Verbindungen, deren Organisation und räumliche Aufteilung jedoch gestört ist. Das dem Narbengewebe direkt anliegende Ende der Myozyten bildet jedoch keinen Glanzstreifen, keine Desmosomen und keine Fascia Adhaerens aus.

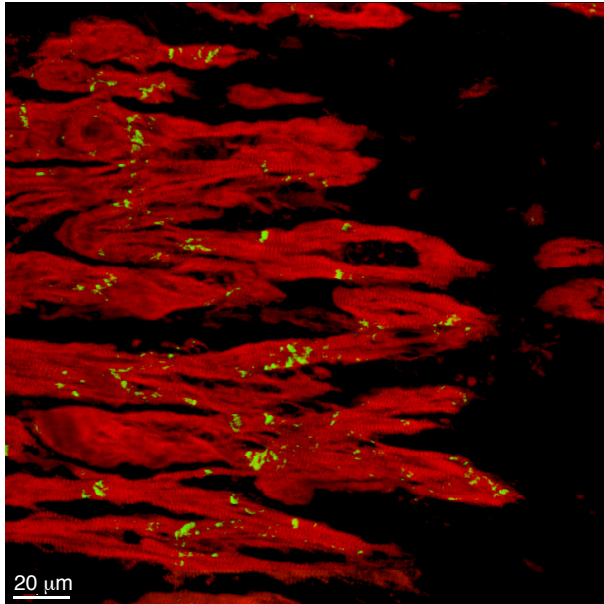


Abbildung 15

Abb. 15: Desmoplakin (grün) und F-Aktin (rot).

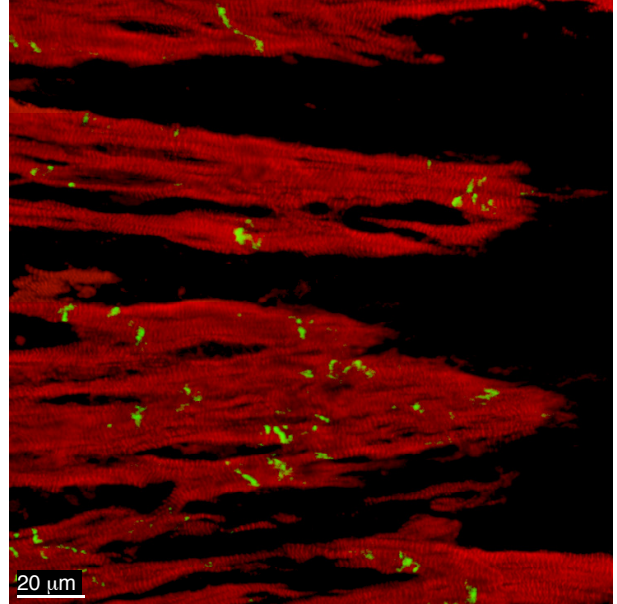


Abbildung 16

Abb. 16: N-Cadherin (grün) und F-Aktin (rot).

Bei genauerer Betrachtung des Infarktareaes konnten wir Zellbrücken entdecken, die gesundes Gewebe vor und hinter der Infarktnarbe verbinden. Diese Zellbrücken konnten dann immunhistologisch und elektronenmikroskopisch als intakte, lebende Kardiomyozyten identifiziert werden.



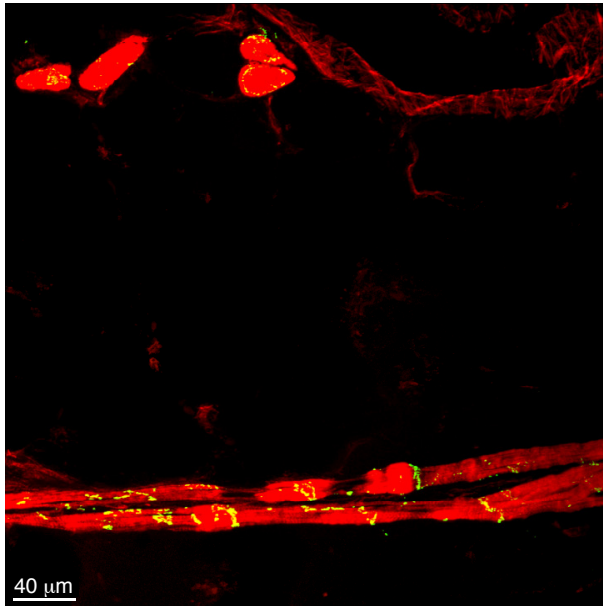


Abbildung 17

Abb. 17: Die obige Abbildung zeigt im unteren Bereich eine Aneinanderreihung von Zellen, die durch intakte Glanzstreifen verbunden sind und von einer gesunden Seite der Narbe zur anderen Seite reichen. Die Zellen zeigen einen nahezu unveränderten Aufbau im Vergleich zur Kontrolle. In Grün sind die Connexin 33 Gap Junctions zu sehen, in Rot das F-Aktin.

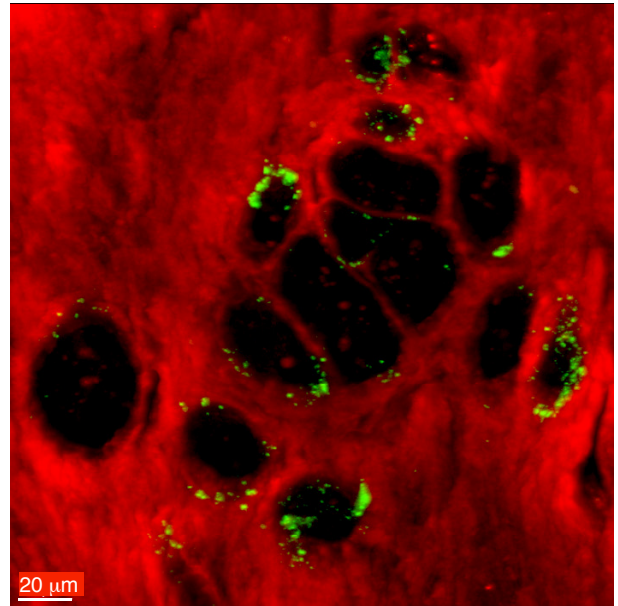


Abbildung 18

Abb. 18: Hier ist eine solche Gewebsbrücke im Transversalschnitt zu sehen. In Grün ist Connexin 33 und in Rot Kollagen VI dargestellt.

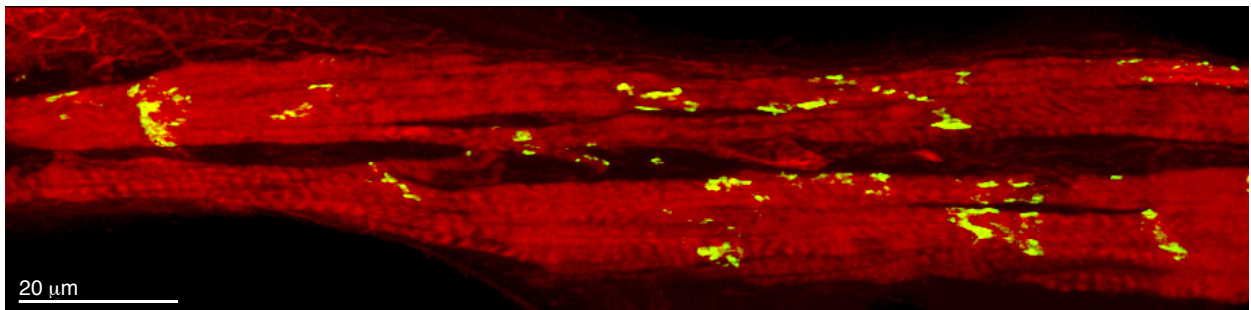
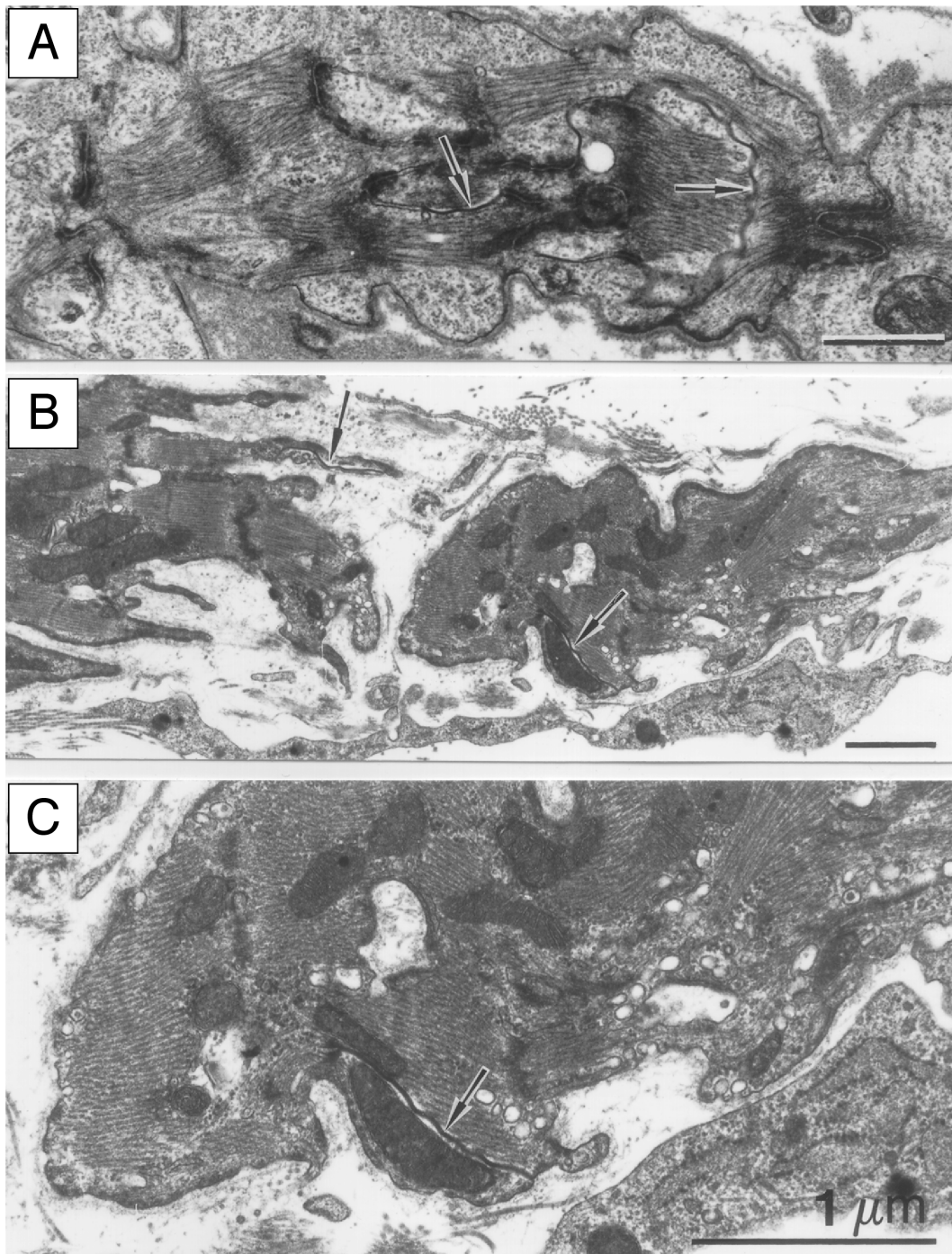


Abb. 19: Diese Ausschnittsvergrößerung des vorangegangenen Bildes (A) verdeutlicht noch einmal, dass die Myozyten dieser Zellbrücken weitestgehend unversehrt sind.



*Abb. 20 A, B, C: Die Abbildungen A-C zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von Myozyten, die aus solch einer Zellbrücke stammen. Die Pfeile bezeichnen die Stellen, an denen benachbarte Zellen durch intakte Gap Junctions verbunden sind. Abbildung C ist eine Vergrößerung der auf Abbildung B in der rechten Hälfte sichtbaren Myozyten.*

### **3.1.2.2. Idiopathische dilatative Kardiomyopathie**

Bei dilatativer Kardiomyopathie sind die Zonen ausgedehnter Fibrosierung am stärksten betroffen, Bereiche also, in denen die streng parallele Anordnung der Muskelfasern nicht mehr vorhanden ist, da das Bindegewebe die einzelnen Stränge der Myozyten auseinanderdrängt.



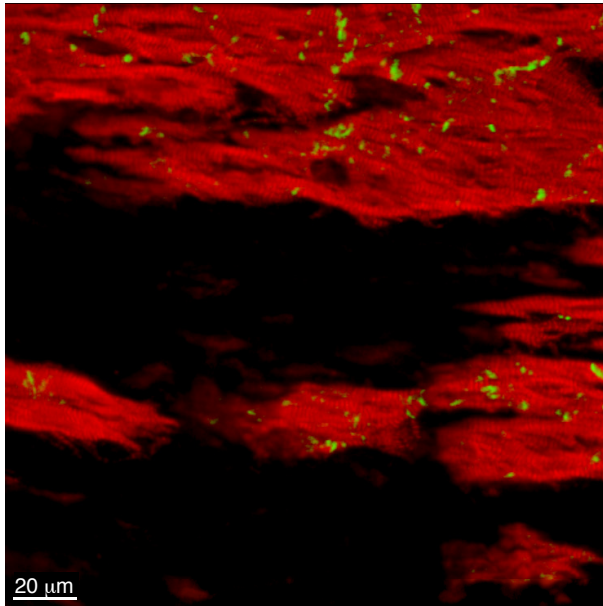


Abbildung 21

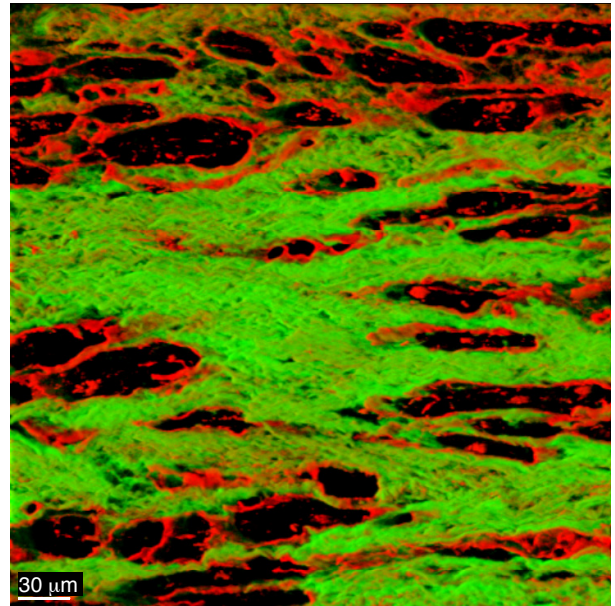


Abbildung 22

Abb. 21: Hier ist zu erkennen, dass sich in der Nähe von stark fibrosierten Arealen im Zuge von dilatativen Kardiomyopathien Struktur und Anordnung der Myozyten ändert. Weder Glanzstreifen, noch einzelne Muskelfasern sind in ihrer charakteristischen Weise zu erkennen. Connexin 43 in Grün, F-Aktin in Rot.

Abb. 22: Diese Abbildung verdeutlicht noch einmal das Ausmaß der Fibrosierung. In Grün ist Kollagen I zu erkennen, in Rot Kollagen III.

Es zeigen sich stark verzweigte Myozyten, die in allen Richtungen mit verschiedenen anderen Myozyten in Verbindung treten, und zahlreiche Glanzstreifen ausgebildet haben. Diese Glanzstreifen erscheinen jedoch in ihrer Struktur aufgelockert und unregelmäßig. (Abb. 23, 24)

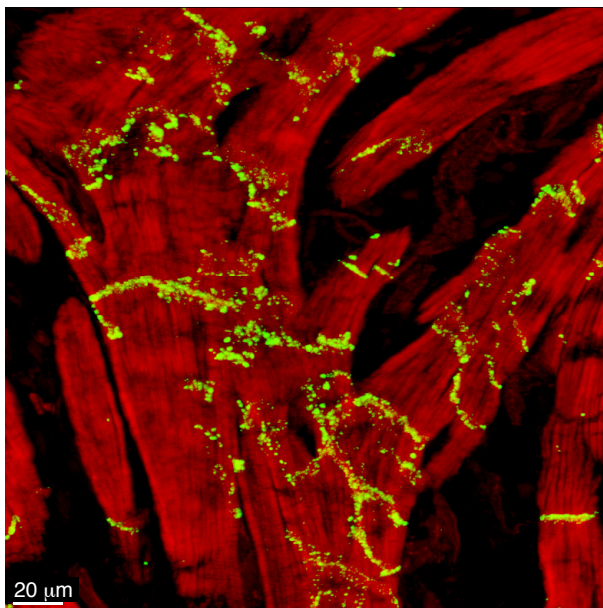


Abbildung 23

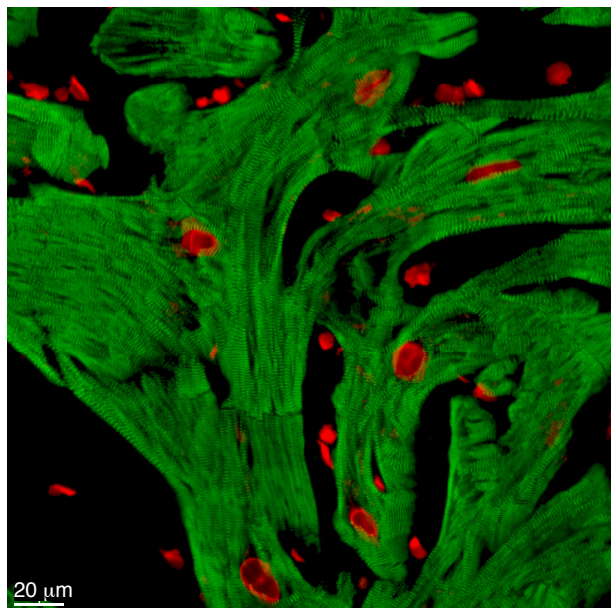


Abbildung 24

Abb. 23: Auf diesem Bild sind die zahlreichen Verzweigungen der Myozyten deutlich zu erkennen. Die auffälligen Unregelmäßigkeiten der Glanzstreifen sind anhand der Färbung für

*Connexin 43 (grün) zu erkennen. In Rot ist F-Aktin gefärbt. Abb. 24: Hier wurden durch Färbung des Myomesins (grün) die kontraktile Elemente der Kardiomyozyten dargestellt. In Rot eine Kernfärbung mit Propidiumjodid.*

Doch nicht nur die Anordnung der Connexin 43 Gap Junctions ist verändert. Auch die Verteilung der anderen Zell-Zell-Verbindungen ist davon in ähnlicher Weise, wie im Bereich der Boarder Zone bei infarziertem Gewebe, betroffen.

Auf transversal angeschnittenen Bereichen war auffallend, dass es zu einem Verlust der großen Gap Junctions im Randbereich des Glanzstreifens kommt. Die für gesundes Myokard typische ringförmige Anordnung großer Gap Junctions ist nahezu aufgehoben, während kleinere Gap Junctions relativ regelmäßig über den Glanzstreifen verteilt erscheinen. (Abb. 25, 26)

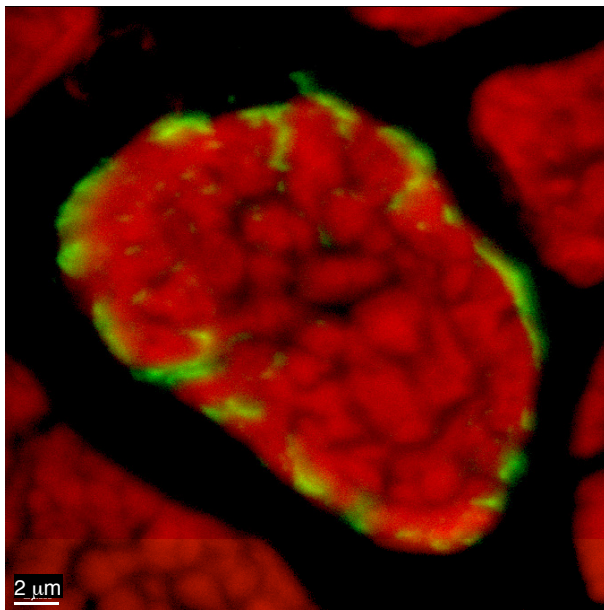


Abbildung 25

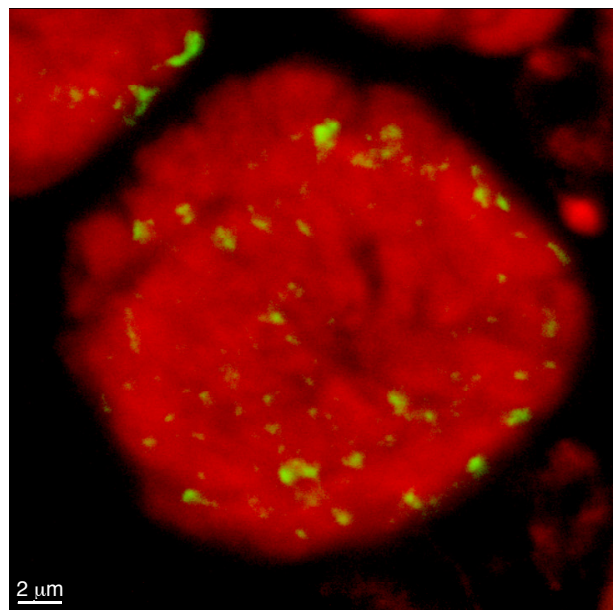
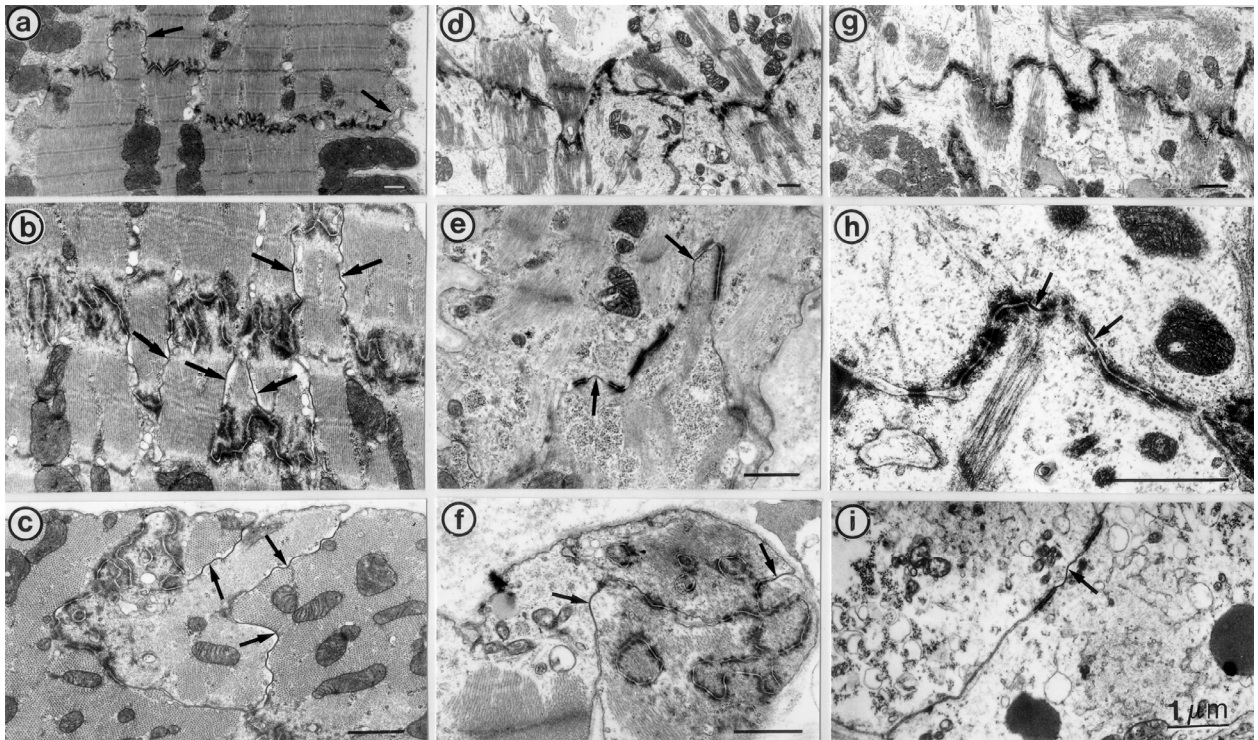


Abbildung 26

*Abb. 25: Diese Abbildung zeigt noch einmal den Ring großer Gap Junctions, der sich in gesundem Myokard in der Peripherie des Glanzstreifens befindet. In Grün Connexin 43, in Rot F-Aktin.*

*Abb. 26: Hier ist der Glanzstreifen einer Zelle eines Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie zu sehen. Die großen Gap Junctions fehlen fast vollständig, der Ring ist nicht mehr zu erkennen. In Grün Connexin 43, in Rot F-Aktin.*



*Abb. 27 a-i: Die obigen Abbildungen von a bis c zeigen die Veränderungen des Glanzstreifens bei leichtgradiger Ausprägung einer dilatativen Kardiomyopathie, von d bis f bei mittelgradiger und von g bis i bei schwergradiger dilatativer Kardiomyopathie. Die Pfeile bezeichnen die Lokalisation der Gap Junctions.*

### **3.1.2.3. Myokarditis**

Myokarditis geschädigte Herzen zeigten weder eine ausgeprägte Fibrosierung, noch narbig veränderte Bereiche. Allerdings konnten wir in Arealen mit besonders starker Lymphozyteninfiltration auch eine Auflockerung der Gap Junctiondichte und Unregelmäßigkeiten der Gap Junctionverteilung feststellen.



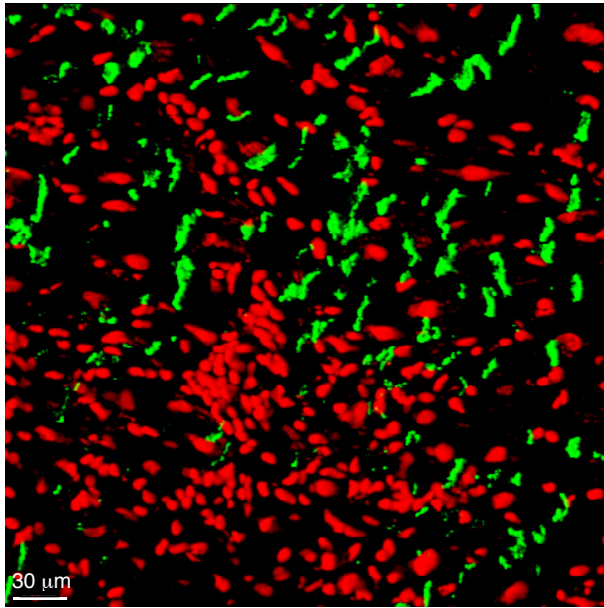


Abbildung 28

Abb. 28: Zeigt eine Doppelfärbung für Connexin 43 (grün) und eine Kernfärbung mit 7-AAD (rot).

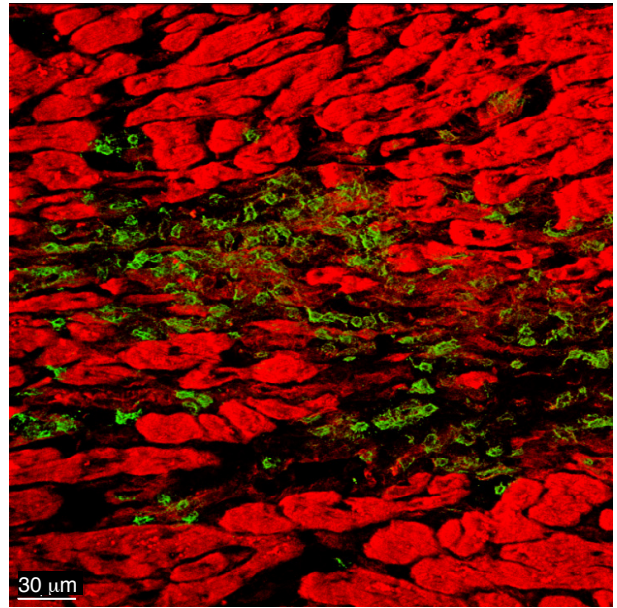


Abbildung 29

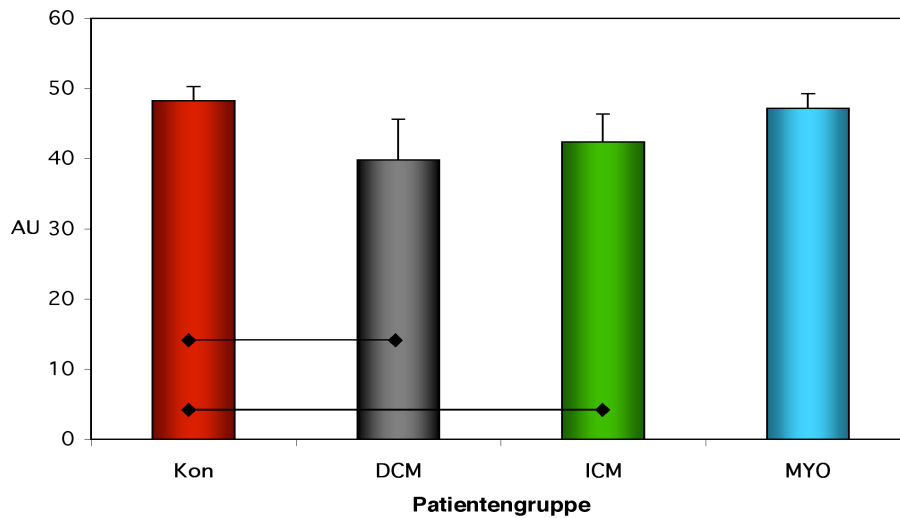
Abb. 29: Hier ist eindrucksvoll die Lymphozyteninfiltration mittels einer Färbung für CD-3 (grün), eines Oberflächenantigens der Lymphozyten, zu sehen. In Rot wurde F-Aktin gefärbt.

## 3.2. Ergebnis der Fluoreszenzmessungen

### 3.2.1. Connexin 43 Dichte pro Glanzstreifen

Die Dichte des Connexinbesatzes wurde anhand der Fluoreszenzintensität pro Flächeneinheit bestimmt. Bei der Messung pro Glanzstreifen ergab sich für alle drei Patientengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (KON;  $100 \pm 3,7 \%$ ) eine Verminderung der Fluoreszenzintensität, wobei sich für die Gruppe der dilatativen Kardiomyopathie (DCM;  $79 \pm 12 \%$ ) und die Gruppe der Infarktpatienten (ICM;  $83 \pm 4 \%$ ) eine statistisch signifikante Verminderung der Intensität darstellte ( $p \leq 0.05$ ). Die Myokarditisgruppe wies statistisch keine verwertbare Verminderung der Fluoreszenzintensität auf (MYO;  $96 \pm 4 \%$ ).

Diagramm 1



*In Diagramm 1 ist dargestellt, wie sich die Fluoreszenzintensität pro Glanzstreifen bei den unterschiedlichen Patientengruppen verhält. (Kon = Kontrolle, DCM = Dilatative Kardiomyopathie, ICM = Koronare Herzerkrankung, MYO = Myokarditis, AU = „arbitrary units“).*

### 3.2.2. Connexin 43 Dichte pro Zellfläche

Die Messung der Gap Junctiondichte pro Zellfläche ergab eine Verminderung der Intensität für alle drei Patientengruppen, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wobei die Gruppe der dilatativen Kardiomyopathie ( $59 \pm 11$  %) sowohl zur Kontrollgruppe ( $100 \pm 36$  %), als auch zur Myokarditisgruppe ( $87 \pm 17$  %) eine statistisch signifikante Verminderung der Fluoreszenzintensität aufwies ( $p < 0.05$ ). Die Gruppe der Infarktpatienten ( $82 \pm 32$  %) zeigte keine statistische Verminderung im Vergleich zur Kontrolle oder den anderen Gruppen.

### 3.2.3. Gap Junctionfläche pro Zellfläche

Die absolute Fläche der Gap Junctions in  $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$  Zellfläche wurde, wie weiter oben schon beschrieben, rechnerisch ermittelt. Bei zunehmender Zellgröße zeigte sich jedoch eine unterschiedliche Zunahme der Fläche der Gap Junctions. Während es in der Kontrollgruppe lediglich bis zu einer Zellgröße von  $3001 - 3500 \mu\text{m}^2$  zu einem konstanten Zuwachs an Gap Junctionfläche kommt, und sie danach wieder abfällt, zeigt sich bei den drei erkrankten Gruppen ein stetiges Wachstum der Gap Junctionfläche, auch über diesen Bereich hinaus.

Diagramm 2

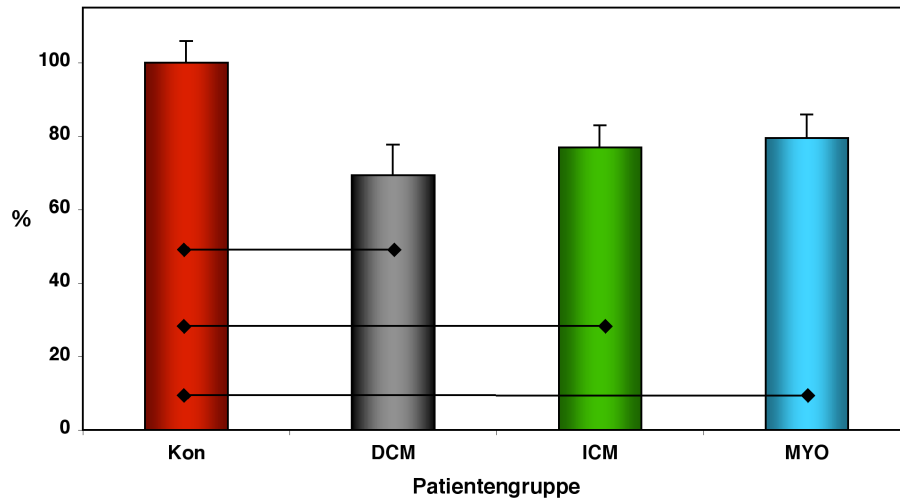
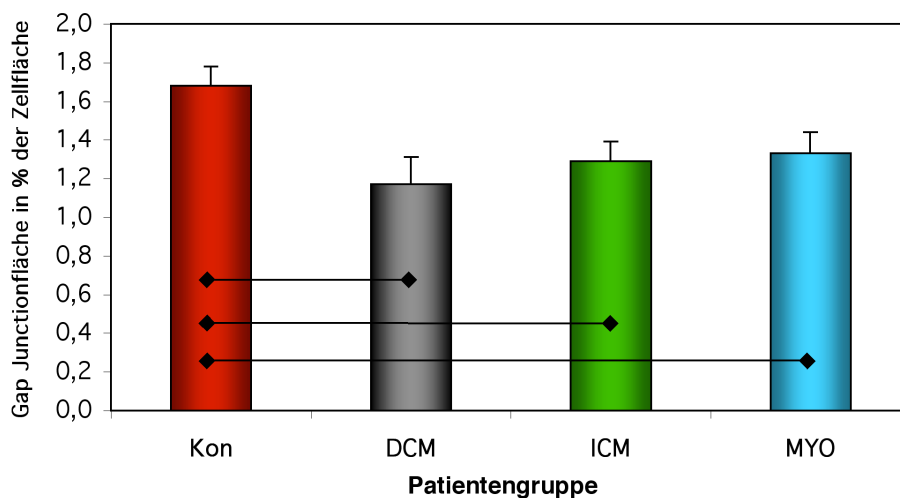


Diagramm 2 zeigt Unterschiede bezüglich der Gap Junctionfläche in  $\mu\text{m}^2$  bezogen auf die Zellgröße in  $\mu\text{m}^2$  in Prozent im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die schwarzen Querbalken bezeichnen die statistisch signifikant unterschiedlichen Gruppen.

Diagramm 3



In Diagramm 3 sind die Ergebnisse der Berechnung der Gap Junctionfläche noch einmal dargestellt als Prozent der Zellfläche, die von Gap Junctions bedeckt wird. Die schwarzen Querbalken bezeichnen die statistisch signifikant unterschiedlichen Gruppen.

Es lässt sich allerdings hier ein Unterschied im Grad der Zunahme der Gap Junctionfläche im Zusammenhang mit der Zunahme der Zellgröße feststellen. Kontrollgruppe ( $r=0,8012$ ) > Myokarditis ( $r=0,2403$ ) > Infarktgruppe ( $r=0,2223$ ) > Dilatative Kardiomyopathie ( $r=0,1684$ ). Die Gruppe der dilatativen Kardiomyopathie bleibt im Grad des Zuwachses deutlich hinter der Kontrolle zurück, nimmt jedoch im Bereich über  $3500 \mu\text{m}^2$  weiterhin konstant zu.

In Prozent der Zellfläche, die von Gap Junctions eingenommen wird, bedeutet dies für die Kontrollgruppe  $1,68\% \pm 0,10$ , gegenüber  $1,17\% \pm 0,14$  bei dilatativen Kardiomyopathien,  $1,29\% \pm 0,10$  bei koronarer Herzerkrankung und  $1,33\% \pm 0,11$  in der Myokarditisgruppe.

### 3.2.4. Gap Junctionfläche pro Zellvolumen

Bei der Berechnung der Gap Junctionfläche pro Zellvolumen in  $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  wird der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen noch deutlicher. Während in der Kontrollgruppe  $0,0055 \pm 0,00063 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  Zellvolumen von Gap Junctions eingenommen werden, sind es bei dilatativen Kardiomyopathien  $0,0024 \pm 0,001 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  Zellvolumen, in der Gruppe mit koronarer Herzerkrankung  $0,0028 \pm 0,007 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  Zellvolumen und bei Myokarditis  $0,0033 \pm 0,007 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  Zellvolumen.

Diagramm 4

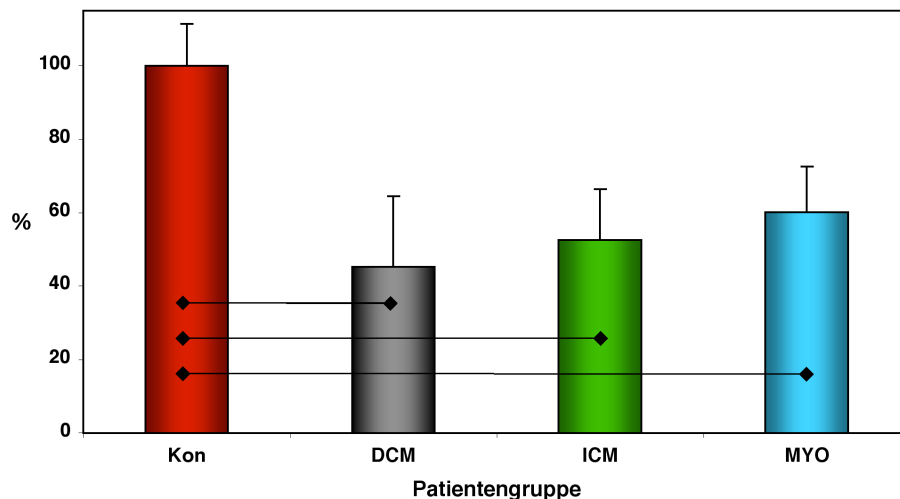


Diagramm 4 zeigt die relativen Unterschiede bezüglich der Gap Junctionfläche in  $\mu\text{m}^2$  pro Zellvolumen in  $\mu\text{m}^3$ , ebenfalls in Prozent im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die schwarzen Querbalken bezeichnen die statistisch signifikant unterschiedlichen Gruppen.

Diagramm 5

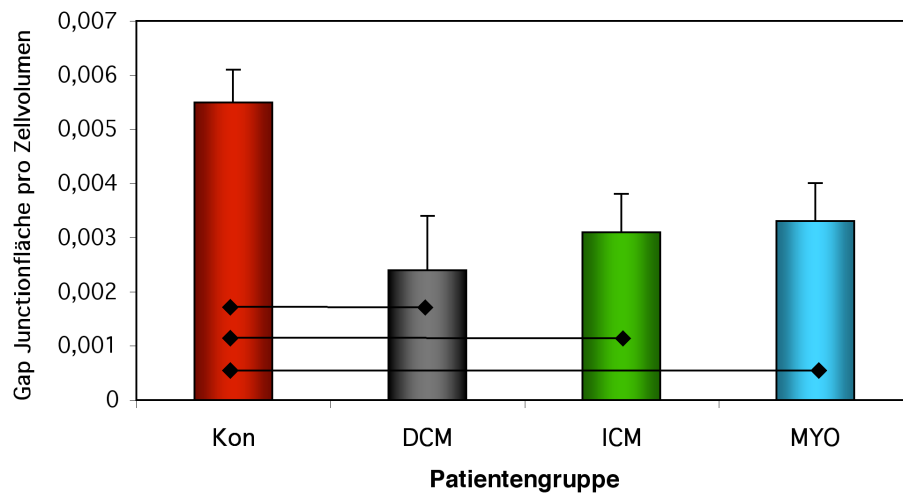


Diagramm 5 zeigt noch einmal die absolute Gap Junctionfläche pro  $\mu\text{m}^3$ . Die schwarzen Querbalken bezeichnen die statistisch signifikant unterschiedlichen Gruppen.



Tabelle 11

**Ergebnis der quantitativen morphologischen Untersuchungen**

Gruppe	Patient #	Gap Junction- fläche pro Zellfläche in Prozent	Gap Junction- fläche pro Zellvolumen ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ )
<b>Kon</b>	1	1.6504	0.00559
	2	1.5124	0.00434
	3	1.8580	0.00643
	4	1.6212	0.00576
	5	1.7782	0.00616
	6	1.7174	0.00559
	7	1.6821	0.00527
	8	1.6224	0.00491
<b>Mittelwert <math>\pm</math> STABW</b>		<b>1.68 <math>\pm</math> 0.10</b>	<b>0.0055<math>\pm</math>0.0006</b>
<b>DCM</b>	1	1.4654	0.00432
	2	1.2685	0.00378
	3	1.0823	0.00198
	4	1.1152	0.00149
	5	1.0595	0.00194
	6	1.0487	0.00199
	7	1.1543	0.00166
<b>Mittelwert <math>\pm</math> STABW</b>		<b>1.17 <math>\pm</math> 0.14</b>	<b>0.0024<math>\pm</math>0.0010</b>
<b>ICM</b>	1	1.4214	0.00289
	2	1.2719	0.00335
	3	1.3217	0.00234
	4	1.2902	0.00281
	5	1.2512	0.00301
	6	1.0888	0.00148
	7	1.3987	0.00408
<b>Mittelwert <math>\pm</math> STABW</b>		<b>1.29 <math>\pm</math> 0.10</b>	<b>0.0031<math>\pm</math>0.0007</b>
<b>MYO</b>	1	1.2690	0.00304
	2	1.1974	0.00214
	3	1.2653	0.00328
	4	1.3772	0.00365
	5	1.5289	0.00444
	6	1.3714	0.00331
<b>Mittelwert <math>\pm</math> STABW</b>		<b>1.33 <math>\pm</math> 0.11</b>	<b>0.0033<math>\pm</math>0.0007</b>

### 3.2.5. Zellgrößenverteilung

Bei den unterschiedlichen Grunderkrankungen stellte sich eine, durch das verschiedene Ausmaß an Hypertrophie begründete, unterschiedliche Verteilung der Zellgrößen heraus. Die durchschnittliche Zellgröße bei Infarktpatienten (untersucht wurden Zellen fernab der Borderzone) lag bei  $2646,52 \mu\text{m}^2 \pm 671,51 \mu\text{m}^2$  (191,19 %  $\pm$  48,51 %) im Vergleich mit der Kontrollgruppe  $1384,23 \mu\text{m}^2 \pm 114,59 \mu\text{m}^2$  (100 %  $\pm$  8,27 %), gefolgt von  $2168,97 \mu\text{m}^2 \pm 253,15 \mu\text{m}^2$  (156,69 %  $\pm$  18,28 %) bei der Gruppe mit dilatativer Kardiomyopathie und  $2122,83 \mu\text{m}^2 \pm$

556,16  $\mu\text{m}^2$  (153,35 %  $\pm$  40,17 %) bei der Gruppe der Myokarditispatienten. Die Zellgröße wurde ausschließlich an streng longitudinal geschnittenen Kardiomyozyten bestimmt.

Diagramm 6

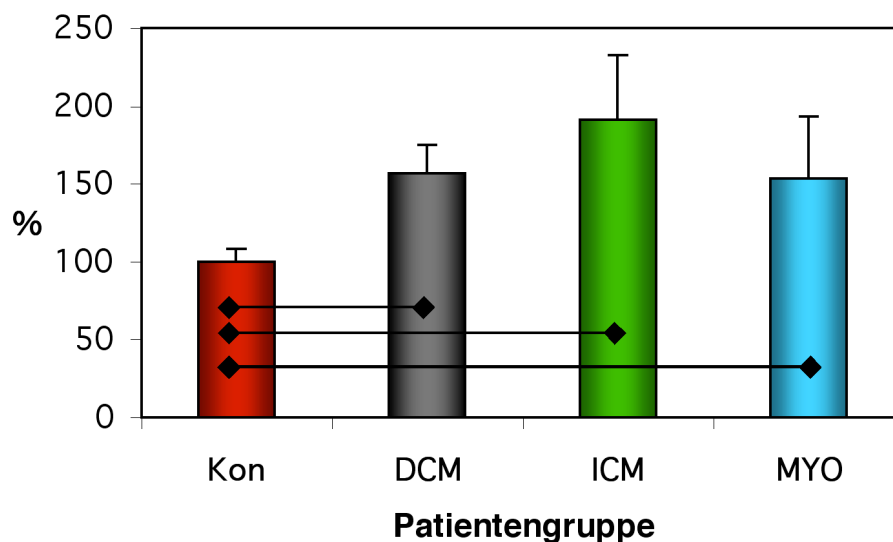


Diagramm 6 zeigt den unterschiedlichen Ausprägungsgrad der Hypertrophie bei den untersuchten Patientengruppen, in Prozent im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die schwarzen Querbalken bezeichnen die statistisch signifikant unterschiedlichen Gruppen.

Diagramm 7

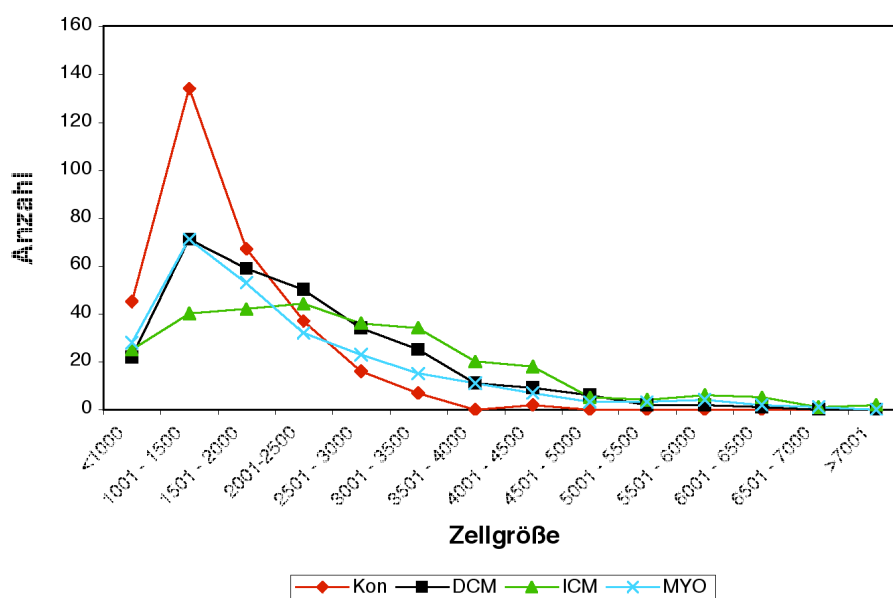


Diagramm 7 zeigt die Anzahl der einzelnen Zellgrößen in 500  $\mu\text{m}^2$ -Schritten bei den unterschiedlichen Grunderkrankungen des Herzens und der Kontrollgruppe.

Die numerische Verteilung zeigt deutliche Unterschiede zwischen den vier untersuchten Gruppen. Während bei der Kontrollgruppe die Anzahl der Zellen unter 2000  $\mu\text{m}^2$  den größten Bestand darstellt und danach stark abfällt, ähnlich einer logarithmischen Verteilung, ergibt sich

bei den drei weiteren Patientengruppen eine völlig andere Verteilung. In der Gruppe der Infarktpatienten liegen im Bereich von 2501 – 3000  $\mu\text{m}^2$  die meisten Zellen, bei dilatativer Kardiomyopathie im Bereich von 1501 – 2500  $\mu\text{m}^2$  und bei Myokarditis im Bereich von 1501 – 2000  $\mu\text{m}^2$ . Bei diesen drei Grunderkrankungen des Herzens steigt die Anzahl der Zellen in den einzelnen Untergruppierungen bis zum jeweiligen Scheitelpunkt stetig an und fällt danach in gleicher Weise wieder ab, ähnlich einer Gaußschen Verteilungskurve.

### 3.2.6. Korrelation von Gap Junctionfläche und Zellgröße

Setzt man die absolute Fläche der Gap Junctions einer Zelle in Bezug zur jeweiligen Größe, so stellt sich heraus, dass die Flächenzunahme der Gap Junctions bei gesunden Herzen in etwa einer linearen Funktion folgt ( $y=0,0228x-5.8218$ ; der Korrelationskoeffizient entspricht  $r=0,8951$ ; s.a. Diagramm 8). Vergleicht man dies mit den Patientengruppen, so fällt auf, dass hier die Größenzunahme der Gap Junctionfläche bei Größenzunahme der Zellen keiner solch klaren Funktion folgt und die Steigungen der Ausgleichsgeraden weitaus geringer ausfällt (DCM:  $y=0,0046x+12,268$ ;  $r=0,4104$ , Diagramm 9; ICM:  $y=0,0057x+16,888$ ;  $r=0,4715$ , Diagramm 10; MYO:  $y=0,0059x+14,444$ ;  $r=0,4902$ , Diagramm 11).

Diagramm 8

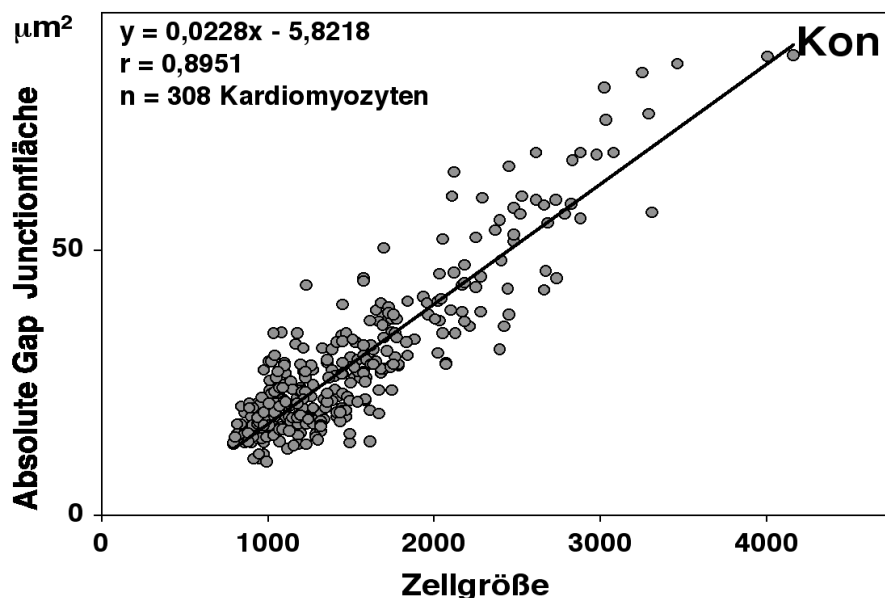


Diagramm 9

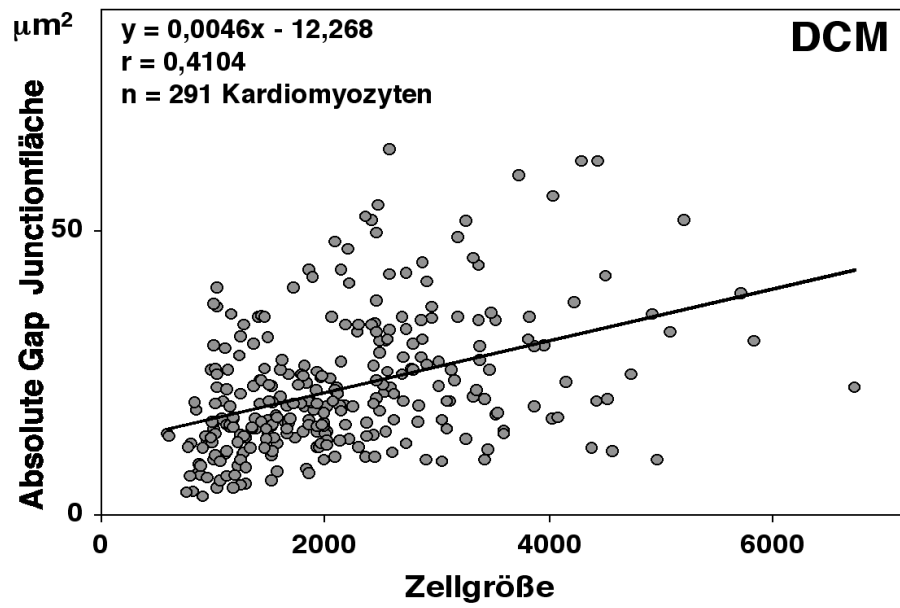


Diagramm 10

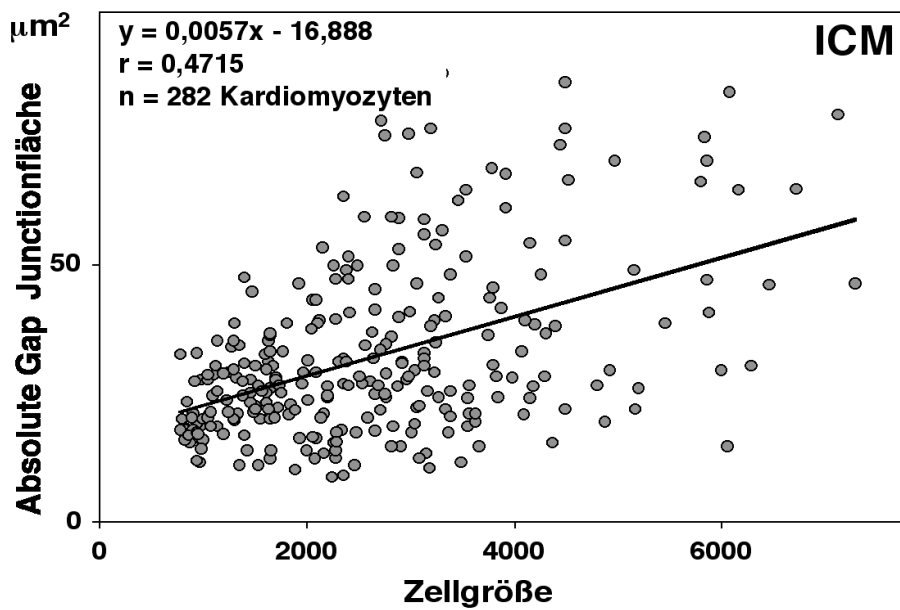


Diagramm 11

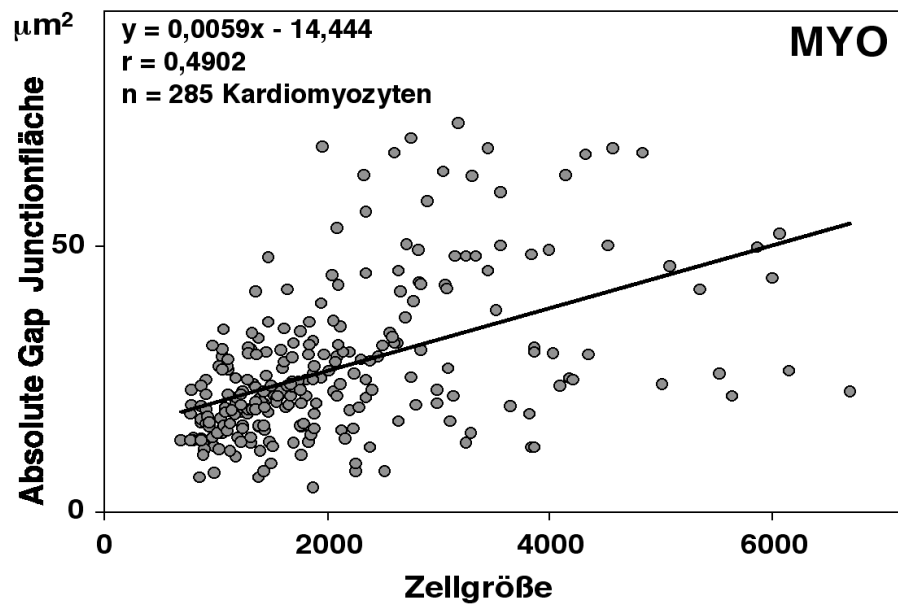


Diagramm 8 - 11 zeigen die Korrelation von Zellgrößenzunahme und Zunahme der Fläche der Gap junction.

## 4. Diskussion

Mit unseren Untersuchungen an chronisch erkrankten menschlichen Herzen konnten wir bezüglich des Gap Junctionproteins Connexin 43 die bis jetzt nur bruchstückhaften Informationen über die Pathogenese von ventrikulären Tachyarrhythmien bei End Stage Heart Failure Patienten ergänzen. Bisherige Untersuchungen bezogen sich meist auf Modelle zur Grundlagenforschung bezüglich der Funktion von Gap Junctions bei der Erregungsleitung im Herzen, anhand von verschiedensten Tiermodellen oder Zellkulturen. Daten, die diese Untersuchungen mit Erkrankungen des menschlichen Herzens in Verbindung brachten, waren jedoch nur sehr wenige vorhanden. Deshalb beschlossen wir, uns mit den qualitativen und quantitativen Veränderungen der Gap Junctions an Ventrikelgewebe von chronisch erkrankten menschlichen Herzen auseinander zu setzen. Da bisher nur sehr wenig histologisch erhobene Daten vorhanden waren, wählten wir den Weg, diese Fragestellung immunhistologisch zu untersuchen. Mittels der konfokalen Lasermikroskopie stand uns ein sehr elegantes Verfahren zur Verfügung, um sowohl qualitative, als auch quantitative Befunde zu erheben.

Um das Ziel unserer Studie, qualitative und quantitative Veränderungen des Gap Junction Besatzes von Kardiomyozyten bei chronischen Herzerkrankungen zu untersuchen, bedienten wir uns der Technik der konfokalen Lasermikroskopie. Diese Technik bietet im Vergleich zu anderen Methoden mehrere Vorzüge.

Zum einen kann der Zustand des Gewebes bei der Untersuchung direkt beurteilt werden, ohne vorherige Prüfung mittels anderer Methoden. Auf diese Weise ist es möglich, die interessierenden Parameter nur in den interessanten Bereichen, beispielsweise die Umgebung der Infarktzone oder Gewebe ohne lokale Läsionen, zu messen um Fehlmessungen zu vermeiden. Aber auch um den Fibrosierungsgrad des Gewebes oder den Hypertrophiegrad zu bestimmen, bietet die Untersuchung mittels Immunfluoreszenz Vorteile, da die Größe der Zellen und das Ausmaß der Fibrosierung wichtige Parameter zur Beurteilung der Relevanz sind, ob die gemessene Menge an Connexin verhältnismäßig viel oder wenig im Vergleich zur Kontrolle ist.

Des weiteren konnten wir mit dem uns zur Verfügung stehenden konfokalen Lasermikroskop einzelne Kardiomyozyten untersuchen, ohne eventuell vorkommende interstitielle Fibrosierung beachten zu müssen. Dies ist wichtig, da es bei Messung des Connexinanteils von Gewebeausschnitten, wie die früher üblichen Gesichtsfeldmessungen, abhängig vom Fibrosierungsgrad zu Messfehlern kommt, weil dieses Gewebe an der Reizleitung nicht teilnimmt, das Verhältnis zwischen gemessener Connexinmenge, Größe und Anzahl der Kardiomyozyten jedoch beeinflusst.

Im Vergleich zu biochemischen Verfahren, die Menge eines Proteins zu bestimmen, wie zum Beispiel mit Hilfe des Western Blots oder Northern Blots, liegt der Vorteil unserer Methode darin, dass sich mit Hilfe immunhistologischer Untersuchungen nur die Menge des wirklich an der Zellkommunikation beteiligten Anteils der Gap Junctions bestimmen lässt. Wird die Menge

des Proteins mittels Western Blot bestimmt, zeigen sich zwei große Probleme. Zum einen wird auch das Protein mitgemessen, das sich zum Zeitpunkt der Entnahme des Gewebes noch in Vesikeln des Golgi-Apparates befand, also noch nicht in die Zellmembran eingebaut war. Zum anderen eben auch hier das Problem, dass unklar ist, ob und wie viel des Gewebes durch Fibrose verändert ist. Diese beiden Faktoren haben entscheidenden Einfluss auf die Interpretation der Ergebnisse. Bei Bestimmung des mRNA Gehaltes durch Northern Blot kann wiederum nicht geklärt werden, ob die Translation zum entsprechenden Protein überhaupt stattfindet. Eine Bestimmung der Proteinmenge kann mit diesem Verfahren nicht durchgeführt werden.

Die Entscheidung, unsere quantitativen Messungen an longitudinal geschnittenem Herzmuskelgewebe durchzuführen, ist vor dem Hintergrund zu sehen, so genau wie möglich die Zellgrößen und die Anzahl der Glanzstreifen zu bestimmen. Eine Untersuchung von transversal geschnittenen Kardiomyozyten ist zur Beurteilung von Veränderungen der räumlichen Gap Junction Verteilung unerlässlich, kann jedoch bei der Bestimmung der Menge des Connexin 43 pro Zelle nur annähernde Ergebnisse bringen, da weder die Länge der Zelle, noch die Anzahl der real vorhandenen Glanzstreifen beurteilt werden kann.

Aus diesen Gründen entschieden wir uns für die Technik des konfokalen Mikroskopierens, um die gemessene Menge des Connexin 43 direkt in Bezug zu dem tatsächlich vorhandenen Herzmuskelgewebe setzen zu können ohne die oben genannten Störgrößen vernachlässigen zu müssen.

Connexin 43 ist die im Ventrikel hauptsächlich vorkommende Connexin Isoform zur Bildung der Gap Junctions des Arbeitsmyokards, während Connexin 40 mehr im Atrium und in den spezialisierten Erregungsleitungsbahnen und Purkinje-Fasern zu finden ist. Connexin 37 ist Bestandteil der Gefäßwandungen und ist nicht in Beziehung zu Herzmuskelzellen zu setzen.

Wir fanden schwerwiegende morphologische Veränderungen der Glanzstreifenproteine Connexin 43, Desmoplakin und N-Cadherin in den Bereichen fokaler Läsionen des Ventrikels im Zuge von Narbenbildung in Folge ischämischer Ereignisse. Ebenso in Arealen ausgedehnter Fibrosierung und bizarr verzweigten Kardiomyozyten bei dilatativen Kardiomyopathien bzw. Lymphozyteninfiltration in Folge chronischer Myokarditis unterschiedlicher Genese. Ergänzend konnten wir mit immunhistologischen und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen nachweisen, dass im Bereich makroskopisch sichtbarer Infarktnarben Zellbrücken aus lebenden Kardiomyozyten bestehen, die untereinander durch intakte Gap Junctions verbunden sind und folglich als akzessorische Leitungsbahn für die Erregungsweiterleitung dienen können.

Aber auch fernab von diesen fokalen Läsionen des Herzmuskels konnten wir in auf den ersten Blick histologisch unauffälligem Myokard qualitative und quantitative Unterschiede des Gap Junction Besatzes im Vergleich zu Kontrollgewebe nachweisen. Wir konnten zeigen, dass es zu einem Verlust der großen Gap Junctions in der Peripherie des Glanzstreifens zugunsten einer

Vermehrung der kleinen zentral liegenden Gap Junctions kommt. Bei den quantitativen Immunfluoreszenzmessungen konnten wir nachweisen, dass es zu einer Verminderung der Connexin 43 Gap Junctions sowohl pro Glanzstreifen, als auch pro Zelle kommt. Noch eindrucksvoller war diese Verminderung bei der Berechnung der absoluten Gap Junctionfläche pro Zellfläche bzw. pro Zellvolumen zu erkennen. Dies war in dieser hohen Auflösung in bisherigen Studien noch nicht möglich gewesen.

Berichte anderer Autoren, dass es im Zuge chronischer Erkrankungen des Herzens zu einem Übergang der Connexin 43 Gap Junctions in andere Connexin Isoformen als Kompensationsversuch des Herzens kommt <sup>61</sup>, konnten wir bei unseren Untersuchungen nicht bestätigen. Weder Connexin 45 noch Connexin 40 oder Connexin 37 konnten in einer Menge nachgewiesen werden, die höher als die der Kontrollgruppe lag. Somit beschränkten wir unsere Untersuchungen auf Veränderungen des Connexin 43 Gap Junction Vorkommens.

Frühere Studien an Herzen mit ischämischen Veränderungen zeigten zwei wichtige Veränderungen der Gap Junctions: Zum einen die Zerstörung der normalen Gap Junction Verteilung bei Zellen im Bereich der Grenzregion des Infarktes. Zum anderen eine signifikante Verminderung des Connexin 43 Gehaltes von linksventrikulären Myokardzellen, die sich in einem Bereich befinden, der nicht narbig verändert ist <sup>53,55</sup>. Diese Ergebnisse konnten wir mit unserer Studie bestätigen. Mit Hilfe immunhistologischer Untersuchungen von Gewebe, welches in unmittelbarer Umgebung des Infarktareaes liegt, konnten wir zeigen, dass sich die sonst ausschließlich auf den Bereich des Glanzstreifens beschränkte Verteilung von Gap Junctions, Fasciae Adherentes und Maculae Adherentes grundlegend geändert hat. So finden sich diese Zellhaften nun auch im Bereich des lateralen Sarkolemmes, und der Glanzstreifen ist nicht mehr in seiner normalen charakteristischen Weise zu identifizieren.

Eine Vielzahl experimenteller und klinischer Untersuchungen berichten darüber, dass die Morphologie von Myozyten in narbig veränderten Regionen des Herzens Änderungen unterliegt, welche mit Remodeling der interzellulären Bindungen assoziiert sind <sup>8,29,45-47,51,58,67-69</sup>. Dies führt zu einer verminderten Erregungsgeschwindigkeit, Leitungsblöcken und komplexen, für derartige Regionen typischen Veränderungen der Erregungsausbreitung <sup>51,70</sup>. Wir konnten mit der hier vorliegenden Studie zeigen, dass diese morphologischen Veränderungen sowohl für die Gap Junctions, als auch für die adhäsiven Zellverbindungen, Fasciae Adherentes und Maculae Adherentes, zutreffen.

Experimentelle Studien an Tieren und an Gewebe menschlicher Patienten konnten einen direkten Zusammenhang von Gap Junction Remodeling und der Entwicklung von ventrikulären Reentrance-Arhythmien belegen <sup>51,70,71</sup>. Durch ihre Funktion als Kanäle zwischen benachbarten Zellen und ihre Durchlässigkeit für Ionen und kleinere Moleküle nehmen sie direkt Einfluss auf die Weiterleitung des Aktionspotentials entlang der Muskelfaser. Durch Veränderungen des Verhältnisses von Zellgröße zu der Menge an Gap Junctions wird die



Erregungsleitungsgeschwindigkeit entscheidend beeinflusst. Im Falle der Verminderung des Gap Junction Besatzes kommt es zu einer Verminderung der Leitungsgeschwindigkeit.

Ein sehr wichtiges histopathologisches Merkmal verheilter Infarktregionen ist das Vorkommen von Myozyten, welche die Narbenregion überbrücken. Dies kann die Entstehung von fatalen ventrikulären Arrhythmien, gefolgt von plötzlichem Herztod bei Infarktpatienten erklären. Das Vorhandensein solcher Brücken wurde schon in den späten 70er Jahren anhand Standard HE-Färbung beschrieben <sup>72</sup>. Durch die Nutzung von immunhistologischen Verfahren konnten Smith et al. <sup>53</sup> 1991 auf sehr elegante Weise nachweisen, dass diese Zellbrücken gesundes Myokard verbinden, und dass diese Zellen untereinander sowohl durch Gap Junctions elektrisch gekoppelt sind, als auch mechanisch durch adhaesive Zellverbindungen. Diese Erkenntnisse konnten wir durch unsere immunokonfokalen Untersuchungen an Herzen von KHK-Patienten bestätigen. Insbesondere konnten wir zeigen, dass diese Brückenzellen eine abnormale Connexin 43 Verteilung aufweisen, die sich nicht auf den Bereich des Glanzstreifens beschränkt, sondern auch den lateralen Bereich des Sarkolemm einnimmt. Zusätzlich konnten wir anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen feststellen, dass diese Zellen lebendig sind und durch strukturell intakte Gap Junctions verbunden sind, obwohl teilweise kein intakter Glanzstreifen nachweisbar war. Die funktionelle Konsequenz des Vorhandenseins solcher Zellbrücken ist die Entstehung von akzessorischen Leitungsbahnen mit verminderter Leitungsgeschwindigkeit, die im nachgeschalteten post-refraktären Herzmuskelgewebe zu ventrikulären Extrasystolen und ventrikulären Tachyarrhythmien führen können.

Die hier beschriebenen Veränderungen der Gap Junction Verteilung in der Grenzregion makroskopisch sichtbarer Infarktnarben konnten wir in unserer Studie auch in Bereichen finden, die nur mikroskopisch Schädigungen aufweisen, beispielsweise in fibrosierten Arealen im Zuge dilatativer Kardiomyopathien oder entzündlich veränderten Bereichen. Unter Berücksichtigung, dass räumliche Unterschiede der Erregungsleitung, lokale Erregungsleitungsblöcke und Reentry-Mechanismen auch in sehr kleinen Myokardarealen entstehen können <sup>73,74</sup>, sprechen unsere Untersuchungsergebnisse für eine Beeinträchtigung der Erregungsweiterleitung auf mikroskopischer Ebene dadurch, dass sie eine Quelle für Mikro-Reentry-Mechanismen darstellen.

Zusätzlich zu den Regionen mit veränderter Gap Junction Verteilung, die mit fokalen Myokardschädigungen assoziiert sind, fanden wir schwerwiegende Abweichungen der Gap Junction Verteilung in Myokardarealen, in denen sich die Muskelfasern nicht streng parallel anordnen, sondern sich als stark verzweigte, teilweise chaotisch angeordnete Myozytenstränge darstellen. Diese Art der Veränderung ist am spezifischsten für hypertrophe Kardiomyopathien, kann jedoch auch bei anderen Erkrankungen des Herzens gefunden werden, einschließlich der dilatativen Kardiomyopathie <sup>75,76</sup>.

Übereinstimmend mit den vorangegangenen Untersuchungsergebnissen bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie<sup>56</sup>, die zu Arrhythmien und plötzlichem Herztod neigen<sup>77</sup>, konnten wir mit dieser Studie zeigen, dass es bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie zu ähnlich schweren Störungen kommt, was als weiteres morphologisches Substrat für die Entstehung von ventrikulären Arrhythmien bei diesem Patientengut anzusehen ist<sup>78</sup>. Auch hier finden sich immunhistologisch erfassbare Störungen des Aufbaus des Glanzstreifens und Veränderungen der räumlichen Verteilung der Gap Junctions bei bizarr verzweigten Herzmuskelzellen.

Während die fokale Störung der Gap Junction Verteilung, die bei allen unseren Patienten mit End-Stage-Heart-Failure ausnahmslos gefunden wurde, zweifellos ein prädisponierender Faktor für die erhöhte Häufigkeit von Arrhythmien und plötzlichem Herztod zu sein scheint, zeigen die weiteren Ergebnisse unserer Untersuchungen an diesen chronisch erkrankten Herzen einen zusätzlichen Aspekt für die Klärung des erhöhten Auftretens rhythmusbedingter Komplikationen.

Die Reduktion des Connexin 43 Gehaltes im Myokard, welches sich nicht in unmittelbarer Umgebung von den fokalen Schädigungen befindet, könnte ein weiterer Grund für die Arrhythmieentstehung im chronisch erkrankten Herzen sein.

Bei den quantitativen immunokonfokalen Messungen des Connexin 43 Gehaltes pro Zelle zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen erkranktem und gesundem Herzen.

Unsere Ergebnisse der immunokonfokalen Messungen der Oberflächendichte der Gap Junctions an longitudinal angeschnittenen Myozyten der Kontrollgruppe ( $0,0055 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  Myozytenvolumen) korrelieren sehr gut mit den schon früher veröffentlichten Ergebnissen bei ebenfalls immunokonfokalen Messungen an transversal angeschnittenen Glanzstreifen ( $0,0051 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  Myozytenvolumen)<sup>55</sup>, beziehungsweise mit den Ergebnissen bei longitudinal geschnittenen Kaninchenherzmuskelzellen, die mittels Immunhistochemie und Lichtmikroskopie ermittelt wurden ( $0,0052 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  Myozytenvolumen)<sup>79</sup>.

Die von uns berechnete Reduktion des Connexingehaltes von 40 – 50 % pro Myozytenvolumen bei Patienten mit unterschiedlichen Herzerkrankungen korreliert wiederum mit früher veröffentlichten immunokonfokalen Analysen von intraoperativen Biopsien bei koronarer Herzkrankheit (47% Reduktion), bei hypertrophiertem Ventrikel (40% Reduktion)<sup>55,80</sup> und bei Hibernating Myokard (33% Reduktion pro Glanzstreifen)<sup>57</sup>, beziehungsweise bei quantitativen Immunoblot-Untersuchungen an explantierten Herzen von Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (50% Reduktion des Connexin 43 Proteins)<sup>61</sup>. Eine signifikante Verminderung des Connexin 43 Gehaltes konnte auch im Tiermodell bei durch chronische Druckschädigung dekompensiertem Herzfehler nachgewiesen werden<sup>21,81</sup>.

Unsere neuen Ergebnisse, dass auch bei Patienten mit chronischer Myokarditis der Connexin 43 Gehalt pro Myozyte vermindert ist, deckt sich mit den Untersuchungen an Zellkulturen, die mit *Trypanosoma cruzi* infiziert worden waren <sup>54</sup>, einem Erreger, der sehr häufig zu inflammatorischen Kardiomyopathien führt. Im Falle der Myokarditis kommt es zwar weniger zu einer Veränderung der Gap Junction Verteilung, jedoch zu einem insgesamt verminderten Gap Junction Gehalt der Myozyten ( $0,0033 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  Myozytenvolumen im Vergleich zu  $0,0055 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  Myozytenvolumen bei der Kontrollgruppe). Des weiteren wurde kürzlich berichtet, dass es im Zuge der Abstoßungsreaktion nach erfolgter Transplantation auch zu einer verminderten Expression von Connexin 43 kommt <sup>82</sup>. Einige Autoren berichten, dass das Vorhandensein von TNF- $\alpha$  im Zuge von Entzündungen des Herzens bzw. eines septischen Geschehens nicht nur Einfluss auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten hat, sondern auch auf die Expression von Connexin 43 <sup>83-88</sup>.

Die hier vorliegende Studie zeigt, dass es bei verschiedenen Erkrankungen des Herzens zu einer Reduktion der Connexin 43 Expression kommt, des wichtigsten Proteins der Zellkommunikation ventrikulärer Kardiomyozyten, was unter klinischen Bedingungen zur Entstehung von Arrhythmien und zum plötzlichen Herztod führen kann. Dass aus einem verminderten Gehalt an Connexin 43 eine verminderte Erregungsleitungsgeschwindigkeit und ventrikuläre Arrhythmien resultieren können, zeigten Studien an heterozygoten Mäusen mit einer Null-Mutation bezüglich des Connexin 43 Genes und einer daraus resultierenden Reduktion des Connexin 43 Gehaltes von ca. 50% <sup>60,89</sup>, was mit den Ergebnissen bei unseren Patienten in etwa übereinstimmt. In einem weiteren Mausmodell konnte eine signifikante Verminderung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit, sowie ein gehäuftes Auftreten des plötzlichen Herztodes durch eine auf das Herz beschränkte Inaktivierung des Connexin 43 Genes gefunden werden <sup>90</sup>.

Vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse, dass es im Zuge der unterschiedlichen chronischen Erkrankungen des Herzens sowohl zu einer Abnahme der Menge an Gap Junctions, als auch zu einer Zunahme der durchschnittlichen Zellgröße kommt, muss bedacht werden, dass drei Faktoren den Widerstand der Herzmuskelzellen entscheidend beeinflussen. Zum einen der veränderte Widerstand abhängig von Menge und Art der Gap Junctions. Je weniger Gap Junctions vorhanden sind, um so höher ist der Widerstand. Des weiteren bilden Gap Junctions, welche aus Connexin 45 bestehen, einen höheren Widerstand als diejenigen aus Connexin 43. Den geringsten Widerstand ergeben Connexin 40 Gap Junctions. Zum anderen muss der zytosolische Widerstand berücksichtigt werden. Große Kardiomyozyten, wie sie in unseren Untersuchungen bei allen Patientengruppen zu finden waren, zeigen einen weitaus größeren Widerstand als die kleineren Zellen der Kontrollgruppe <sup>45</sup>. Ein erhöhter Widerstand wiederum bedingt eine Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit. Einige Autoren postulieren, dass den wichtigsten Parameter die Zellgröße darstellt <sup>9</sup>. Insgesamt gesehen ist die Leitungsgeschwindigkeit also von der Leitfähigkeit der Gap Junctions und dem Widerstand von

Zytosol und den entsprechenden Connexinen abhängig. Die Leitfähigkeit der Gap Junctions ist wiederum von der Gesamtfläche der Gap Junctions und deren Größe abhängig.

Ein Teil unserer Studie widmete sich dem Verhältnis zwischen Zellgröße und der Gap Junctionfläche pro Zelle. Es zeigte sich, dass es bei der Kontrollgruppe bei Zunahme der Zellgröße zu einem annähernd linearen Anstieg der Gap Junctionfläche kommt. Während dies bei den drei untersuchten Patientengruppen nicht zu beobachten war. Zwei Tendenzen waren hier festzustellen, zum einen eine zahlenmäßige Zunahme größerer Zellen und zum anderen eine weitaus geringere Zunahme der Gap Junctionfläche pro Zelle. Dies war bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie am stärksten ausgeprägt, gefolgt von ischämisch verändertem Gewebe und am wenigsten bei Myokarditispatienten, welche sich aber immer noch stark von der Kontrollgruppe unterschieden. Wir sind der Meinung, dass man die beiden Faktoren - Größenzunahme der Zellen und Verminderung der Gap Junctionfläche pro Zelle - nicht unabhängig von einander betrachten kann. Es ist sicher ein Zusammenspiel von beiden, das die Erregungsleitung im Herzen beeinflusst<sup>91</sup>. Es zeigte sich jedoch, dass das Verhältnis von Gap Junctionfläche zu Zellgröße lediglich die hypertrophierten Kardiomyozyten betrifft. Zellen des erkrankten Myokards, welche noch nicht hypertrophiert waren, zeigten ein ähnliches Verhältnis dieser beiden Parameter wie die Zellen der Kontrollgruppe. Hier zeigen sich Möglichkeiten für therapeutische Angriffspunkte. Äußerst vielversprechende Ergebnisse zeigten Studien, bei denen mit Hilfe von ACE-Hemmern eine bereits bestehende Hypertrophie günstig beeinflusst werden konnte. Weitere Ergebnisse stehen hier jedoch noch aus.

Matsushita et al. konnten an einem Tiermodell mit Ratten zeigen, dass es im Zuge von Infarktgeschehen im Bereich der direkt an den Infarkt angrenzenden Myozyten in der Akutphase zum Verschwinden der Gap Junctions kommt, während Desmosomen und Fasciae Adherentes in fast unveränderter Weise weiter bestehen. Erst in der Heilungsphase treten Gap Junctions wieder auf, sind jedoch nicht mehr in ihrer ursprünglichen Form verteilt. Anhand unserer Untersuchungen können wir bestätigen, dass sich die Gap Junctions der sich der Infarktnarbe anschließenden Myozyten nicht mehr als klar definierten Glanzstreifen darstellen, sondern sich auch auf das laterale Sarkolemm verteilt haben; ebenso wie die Desmosomen und Fasciae Adherentes<sup>58</sup>.

Die Fragen, auf welcher Ebene es dazu kommt, dass im Zuge der Erkrankungen das Verhältnis Gap Junctionfläche zu Zellgröße aus dem Gleichgewicht gerät, ist weiterhin ein viel diskutiertes Thema. Es konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden, ob die Störung auf mRNA-Ebene<sup>61</sup> oder auf Proteinebene liegt.

Bei der Messung der Fluoreszenzintensität pro Glanzstreifen als Maß für den Gehalt an Connexin 43, wie oben ausgeführt, konnte eine signifikante Verminderung der Intensität pro Glanzstreifen in der Gruppe mit dilatativer Kardiomyopathie festgestellt werden. Die beiden anderen Patientengruppen wiesen keine sichere Verminderung des Connexin 43 Gehaltes im

Vergleich zur Kontrolle auf. Diese Ergebnisse sind jedoch nur als Tendenz zu interpretieren, da sie die Zellgröße nicht berücksichtigen. Durch die Zunahme des Zelldurchmessers verteilen sich nun die Gap Junctions auf ein weitaus größeres Gebiet, was die Dichte des Proteins, und damit die Fluoreszenzintensität herabsetzt. Erst durch die Korrelation der Fluoreszenzintensität und der errechneten Gap Junctionfläche mit der Zellgröße bzw. mit dem Zellvolumen ist es möglich, diese Ergebnisse entsprechend zu interpretieren.

## 5. Zusammenfassung

Gap Junctions spielen eine wichtige Rolle bei der Erregungsleitung des Herzens. Der Nachweis, dass Veränderungen ihrer Verteilung bzw. der Expression des Gap Junctionproteins Connexin zur Störung der normalen Erregungsleitung und somit zur Entstehung von Arrhythmien führt, konnte im Laufe der letzten Jahre immer weiter untermauert werden. Es war jedoch weitgehend unbekannt, ob diese Veränderungen ein generelles Problem des chronisch erkrankten Herzens sind, oder ob dies an spezielle Pathomechanismen der unterschiedlichen Erkrankungen gebunden ist. Das Ziel unserer Studie war es, Veränderungen des Gap Junctionproteins Connexin 43 an Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, koronarer Herzerkrankung und Myokarditis zu untersuchen. Dieses Protein ist das wichtigste Gap Junctionprotein des ventrikulären Arbeitsmyokards.

Gewebeproben des menschlichen linken Ventrikels wurden nach der Explantation erkrankter Herzen in flüssigem Stickstoff eingefroren und immunhistologisch mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Auf diese Weise konnten wir sowohl qualitative als auch quantitative Daten der verschiedenen Gewebe erheben.

Es zeigte sich eine stark veränderte Verteilung der Connexin 43 Gap Junctions im Bereich fokaler Läsionen des Ventrikels, beispielsweise in an die Infarktnarbe angrenzenden Arealen (ICM), oder ausgedehnter Fibrosierung (DCM), aber auch andeutungsweise in Bereichen entzündlicher Lymphozyteninfiltration (MYO). Gemeinsam ist allen drei Beispielen, dass es zu einer Lateralisation der Gap Junctions kommt, also zu einer Verteilung der Gap Junctions auf das laterale Sarkolemm. Aber auch ein Verlust der großen Gap Junctions in der Peripherie des Glanzstreifens war zu beobachten. Es zeigten sich also deutliche qualitative Veränderungen bezüglich des Gap Junction Besatzes, im Sinne einer räumlichen Umverteilung im Vergleich zum Kontrollgewebe.

Das Myokard fern von diesen fokalen Läsionen zeigte eine deutliche Reduktion der Gap Junctionfläche pro Zellfläche bzw. pro Zellvolumen. Diese Reduktion ist bei allen drei untersuchten Patientengruppen zu finden, ist jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Am deutlichsten ist dies bei Patienten mit einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie ausgeprägt, gefolgt von Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Bei der Gruppe der Myokarditispatienten ist diese Reduktion am geringsten ausgeprägt, zeigt jedoch auch eine signifikante Verminderung der Gap Junctionfläche pro Zellfläche bzw. pro Zellvolumen im Vergleich zum Kontrollgewebe.

Zusammengefasst lässt sich anhand der Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit sagen, dass fokale Desorganisation der Gap Junction Verteilung und verminderte Expression von Connexin 43 im gesamten Arbeitsmyokard typische Merkmale des myokardialen Remodelings sind. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von ventrikulären Arrhythmien im chronisch erkrankten menschlichen Herzen, unabhängig von der zu Grunde liegenden Pathogenese. Die

von uns untersuchten drei Patientengruppen, idiopathische dilatative Kardiomyopathie, koronare Herzerkrankung und Myokarditis, stellen einen Querschnitt durch sehr häufig vorkommende chronische Erkrankungen des menschlichen Herzens dar.

Es bedarf weiterer Untersuchungen, inwieweit diese Veränderungen schon im Frühstadium dieser Erkrankungen, bzw. bei anderen Erkrankungen des Herzens, z.B. Herzklappendefekten, eine Rolle spielen. Des Weiteren ist der Frage nachzugehen, inwiefern therapeutisch Nutzen aus dieser Erkenntnis gezogen werden kann. Erste Ansätze durch Therapie mit ACE-Hemmern müssen auf ihren Erfolg hin kontrolliert werden, ob die Reduktion der Hypertrophie das Verhältnis von Gap Junctionfläche zur Zellgröße beeinflusst.

## Summary:

Gap junctions (GJ) are important determinants of cardiac conduction and the evidence has recently emerged that altered distribution of these junctions and changes in the expression of their constituent connexins (Cx) may lead to abnormal coupling between cardiomyocytes and likely contribute to arrhythmogenesis. However, it is largely unknown whether changes in the expression and distribution of the major cardiac GJ protein, Cx43 is a general feature of diverse chronic myocardial diseases or is confined to some particular pathophysiological settings. In the present study, we therefore set out to investigate qualitatively and quantitatively the distribution and expression of Cx43 in normal human myocardium and in patients with dilated (DCM), ischemic (ICM), and inflammatory cardiomyopathies (MYO). Left ventricular tissue samples were obtained at the time of cardiac transplantation and investigated with immunoconfocal and electron microscopy. As compared with the control group, Cx43 labeling in myocytes bordering regions of healed myocardial infarction (ICM), small areas of replacement fibrosis (DCM) and myocardial inflammation (MYO) was found to be highly disrupted instead of being confined to the intercalated discs. In all groups, myocardium distant from these regions showed an apparently normal Cx43 distribution at the intercalated discs. Quantitative immunoconfocal analysis of Cx43 in the latter myocytes revealed that the Cx43 area per myocyte area or per myocyte volume is significantly decreased by respectively 30% and 55% in DCM, 23% and 48% in ICM, and by 21% and 40% in MYO as compared with normal human myocardium. In conclusion, focal disorganization of GJ distribution and down-regulation of Cx43 are typical features of myocardial remodeling that may play an important role in the development of an arrhythmogenic substrate in human cardiomyopathies<sup>91</sup>.



## **6. Anhang**

### **6.1. PBS - Lösung**

Zur Herstellung von PBS-Lösung (Phosphate balanced salt solution) benötigt man die vier nachfolgenden chemischen Verbindungen und destilliertes Wasser.

a) Stocklösung:

- |                      |  |
|----------------------|--|
| 5 Liter Aqua dest. + | (1) 397,4g NaCl  |
|                      | (2) 10,0g KCl  |
|                      | (3) 10,0g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    |
|                      | (4) 88,75g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O |

b) PBS Gebrauchslösung

4,5 Liter Aqua dest. + 0,5 Liter Stock - Solution

Danach muss der pH-Wert auf 7,4 eingestellt werden.

### **6.2. Mowiol - Einbettmedium**

Mowiol ist das Medium, das zum Einschließen der histologischen Schnitte verwendet wird.

Zusammensetzung des Mowiols und Mischungsverhältnisse:

1. 4 ml PBS-Lösung + 1g Mowiol, 16 h rühren.
2. 2 ml H<sub>2</sub>O-freies Glycin zugeben und weitere 16 h rühren.
3. 15 min in der Zentrifuge bei 12000 rpm zentrifugieren.
4. Den Überstand abgießen und verwenden.
5. Die Lagerung von nicht gebrauchtem Mowiol findet im Kühlschrank bei +4C° statt

### **6.3. Objektträger beschichten**

Die Objektträger, die wir verwendeten, wurden uns unbeschichtet geliefert. Damit die Schnitte besser auf der Glasfläche haften bleiben, beschichteten wir diese mit einer Silikonmischung. Zu Anfang wurden die Objektträger von uns gewaschen:

1. 30 min in heißem Wasser mit geeignetem Spülmittel.

2. 15 min unter fließendem Wasser abwaschen.
3. 10 min unter fließendem Aqua dest. abwaschen.
4. Abtropfen lassen.
5. Über Nacht im Wärmeschränk bei 42 C° trocknen.

Danach beschichten:

6. 5 sec in 3-Aminopropyltriethoxy-Silane (SIGMA) mit Aceton (2:100) eintauchen.
7. Einmal in reines Aceton eintauchen.
8. Zweimal in Aqua dest. eintauchen.
9. Über Nacht bei 42 C° im Wärmeschränk trocknen.

Die fertigen Objektträger werden in staubfreien Kammern aufbewahrt.

## 7. Literaturnachweis

1. Page E. Cardiac gap junctions. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. *The heart and cardiovascular system*. New York: Raven Press; 1992: 1003-1047.
2. Page E, McCallister LP. Studies on the intercalated disk of rat left ventricular myocardial cells. *J Ultrastruct Res*. 1973;43:388-411.
3. Fry D, Scales D, Inesi G. The ultrastructure of membrane alterations of enzymatically dissociated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1979;11:1151-1163.
4. Mazet F, Wittenberg B, Spray D. Fate of intercellular junctions in isolated adult rat cardiac cells. *Circ Res*. 1985;56:195-204.
5. Gross W, Bucher O. Zur discus intercalaria-Bildung in der Kultur. *Z Mikroskop-Anat Forsch*. 1977;91:430-432.
6. Severs N, Slade A, Powell T, Twist V. Ultrastructure of the sarcolemma and intercalated disc in isolated rat myocytes. *Basic Res Cardiol*. 1985;80:35-40.
7. Shibata Y, Nakata K, Page E. Ultrastructural changes during development of gap junctions in rabbit left ventricular myocardial cells. *J Ultrastruct Res*. 1980;71:258-271.
8. Peters NS, Wit AL. Myocardial architecture and ventricular arrhythmogenesis. *Circulation*. 1998;97:1746-1754.
9. Spach MS, Heidlage F, Dolber PC, Barr RC. Electrophysiological effects of remodeling cardiac gap junctions and cell size. Experimental and model studies of normal cardiac growth. *Circ Res*. 2000;86:302-311.
10. Saffitz J, Kanter H, Green K, Tolley T, Beyer E. Tissue-specific determinants of anisotropic conduction velocity in canine atrial and ventricular myocardium. *Circ Res*. 1994;74:1065-1070.
11. Severs NJ. Gap junction size and orientation at the cardiac intercalated disk. *Circ Res*. 1989;64:1458-1461.
12. Hoyt H, Cohen M, Saffitz J. Distribution and three-dimensional structure of intercellular junctions in canine myocardium. *Circ Res*. 1989;64:563-574.
13. Severs NJ. The cardiac gap junction and intercalated disk. *Int J Cardiol*. 1990;26:137-173.
14. Gros DB, Jongsma HJ. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays*. 1996;18:719-730.
15. Saffitz JE, Kanter HL, Green KG, Tolley TK, Beyer EC. Tissue-specific determinants of anisotropic conduction velocity in canine atrial and ventricular myocardium. *Circ Res*. 1994;74:1065-1070.

16. Hall JE, Gourdie RG. Spatial organization of cardiac gap junctions can affect access resistance. *Microsc Res Tech*. 1995;31:446-451.
17. Bruzzone R, White TW, Goodenough DA. The cellular Internet: on-line with connexins. *Bioessays*. 1996;18:709-18.
18. De Maio A, Vega VL, Contreras JE. Gap junctions, homeostasis, and injury. *J Cell Physiol*. 2002;191:269-282.
19. Simon AM, Goodenough DA. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol*. 1998;8:477-83.
20. Morley GE, Ek-Vitorin JF, Taffet SM, Delmar M. Structure of connexin43 and its regulation by pHi. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 1997;8:939-51.
21. Bastide B, Neyses L, Ganten D, Paul M, Willecke K, Traub O. Gap junction protein connexin40 is preferentially expressed in vascular endothelium and conductive bundles of rat myocardium and is increased under hypertensive conditions. *Circ Res*. 1993;73:1138-1149.
22. Davis LM, Rodefeld ME, Green K, Beyer EC, Saffitz JE. Gap junction phenotypes of the human heart and conduction system. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1995;6:813-822.
23. De Maziere A, Analbers L, Jongsma HJ, Gros D. Immunoelectron microscopic visualization of the gap junction protein connexin40 in the mammalian heart. *Eur J Morphol*. 1993;31:51-54.
24. Dupont E, Ko Y-S, Rothery S, Coppen S, Baghai M, Haw M, Severs NJ. The gap-junctional protein connexin40 is elevated in patients susceptible to postoperative atrial fibrillation. *Circulation*. 2001;103:842-849.
25. Gourdie RG, Severs NJ, Green CR, Rothery S, Germroth P, Thompson RP. The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *J Cell Sci*. 1993;105:985-991.
26. Gros D, Jarry-Guichard T, Ten Velde I, de Maziere A, van Kempen MJA, Davoust J, Briand JP, Moorman AFM, Jongsma HJ. Restricted distribution of connexin40, a gap junctional protein, in mammalian heart. *Circ Res*. 1994;74:839-851.
27. Oosthoek PW, Virágh S, Lamers WH, Moorman AFM. Immunohistochemical delineation of the conduction system, II: the atrioventricular node and Purkinje fibers. *Circ Res*. 1993;73:482-491.
28. Severs NJ, Dupont E, Kaprielian RR, Yeh HI, Rothery S. Gap junctions and connexins in the cardiovascular system. In: Yacoub MH, Carpentier A, Pepper J, Fabiani J-N, eds. *Annual of Cardiac Surgery 1996: 9th edition*. London: Current Science; 1996: 31-44.

29. Severs NJ, Rothery S, Dupont E, Coppen SR, Yeh H-I, Ko Y-S, Matsushita T, Kaba R, Halliday D. Immunohistochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system. *Microsc Res Tech.* 2001;52:301-322.
30. van Kempen MJA, Ten Velde I, Wessels A, Oosthoek PW, Gros D, Jongsma HJ, Moorman AFM, Lamers WH. Differential connexin distribution accommodates cardiac function in different species. *Microsc Res Tech.* 1995;31:420-436.
31. Verheule S, van Kempen MJA, te Welscher PHJA, Kwak BR, Jongsma HJ. Characterization of gap junction channels in adult rabbit atrial and ventricular myocardium. *Circ Res.* 1997;80:673-681.
32. Kwong KF, Schuessler RB, Green KG, Laing JG, Beyer EC, Boineau JP, Saffitz JE. Differential expression of gap junction proteins in the canine sinus node. *Circ Res.* 1998;82:604-612.
33. Vozzi C, Dupont E, Coppen SR, Yeh HI, Severs NJ. Chamber-related differences in connexin expression in the human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:991-1003.
34. Gourdie RG, Green CR, Severs NJ. Gap junction distribution in mammalian myocardium revealed by an anti-peptide antibody and laser scanning confocal microscopy. *J Cell Sci.* 1991;99:41-45.
35. Green CR, Peters NS, Gourdie RG, Rothery S, Severs NJ. Validation of immunohistochemical quantification in confocal scanning laser microscopy: a comparative assessment of gap junction size with confocal and ultrastructural techniques. *J Histochem Cytochem.* 1993;41:1339-1349.
36. Kanter HL, Laing JG, Beau SL, Beyer EC, Saffitz JE. Distinct patterns of connexin expression in canine Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ Res.* 1993;72:1124-1131.
37. Davis LM, Kanter HL, Beyer EC, Saffitz JE. Distinct gap junction protein phenotypes in cardiac tissues with disparate conduction properties. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:1124-1132.
38. Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer E-P, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res.* 2002;54:000-000.
39. Kostin S, Schaper J. Tissue-specific patterns of gap junctions in adult rat atrial and ventricular cardiomyocytes in vivo and in vitro. *Circ Res.* 2001;88:933-939.
40. Litchenberg WH, Norman LW, Holwell AK, Martin KL, Hewett KW, Gourdie RG. The rate and anisotropy of impulse propagation in the postnatal terminal crest are correlated with remodeling of Cx43 gap junction pattern. *Cardiovasc Res.* 2000;45:379-387.
41. Thomas SA, Schuessler RB, Berul CI, Beardslee MA, Beyer EC, Mendelsohn ME, Saffitz JE. Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular

- conduction: Evidence for chamber-specific molecular determinants of conduction. *Circulation*. 1998;97:686-691.
42. Kanter H, Laing J, Beau S, Beyer E, Saffitz J. Distinct patterns of connexin expression in canine Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ Res*. 1993;72:1124-1131.
  43. Coppen SR, Dupont E, Rothery S, Severs NJ. Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ Res*. 1998;82:232-243.
  44. Coppen SR, Severs NJ, Gourdie RG. Connexin45 ( $\alpha 6$ ) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart. *Dev Genet*. 1999;24:82-90.
  45. Jongsma HJ, Wilders R. Gap junctions in cardiovascular disease. *Circ Res*. 2000;86:1193-1197.
  46. van Veen TAB, van Rijen HVM, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res*. 2001;51:217-229.
  47. Kanno S, Saffitz JE. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Pathol*. 2001;10:169-177.
  48. Severs NJ. Cardiac muscle cell interaction: from microanatomy to the molecular make-up of the gap junction. *Histol Histopathol*. 1995;10:481-501.
  49. Saffitz JE, Davis LM, Darrow BJ, Kanter HL, Laing JG, Beyer EC. The molecular basis of anisotropy: role of gap junctions. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1995;6:498-510.
  50. Severs N, Dupont E, Kaprielian R, Yeh H, Rothery s. Gap junctions and connexins in the cardiovascular system. In Yacoub MH, Carpentier A, Pepper J, et al, eds: *Annual of Cardiac Surgery 1996: 9th edition*. Current Science, London,. 1996;31-44.
  51. Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL. Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation*. 1997;95:988-996.
  52. Luke R, Saffitz J. Remodeling of ventricular conduction pathways in healed canine infarct border zones. *J Clin Invest*. 1990;87:1594-1602.
  53. Smith JH, Green CR, Peters NS, Rothery S, Severs NJ. Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease: an immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy. *Am J Pathol*. 1991;139:801-821.
  54. Campos de Carvalho AC, Tanowitz HB, Wittner M, Dermietzel R, Roy C, Hertzberg EL, Spray DC. Gap junction distribution is altered between cardiac myocytes infected with *Trypanosoma cruzi*. *Circ Res*. 1992;70:733-742.

55. Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Reduced content of connexin 43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation*. 1993;88:864-875.
56. Sepp R, Severs N, Gourdie R. Altered patterns of cardiac junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 1996;76:412-417.
57. Kaprielian RR, Gunning M, Dupont E, Sheppard MN, Rothery SM, Underwood R, Pennel DJ, Fox Kim, Pepper J, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Downregulation of immunodetectable connexin43 and decreased gap junction size in the human left ventricle. *Circulation*. 1998;97:651-660.
58. Matsushita T, Oyamada M, Fujimoto K, Yasuda Y, Masuda S, Wada Y, Oka T, Takamatsu T. Remodeling of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions at the border zone of rat myocardial infarcts. *Circ Res*. 1999;85:1046-1055.
59. Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, Emdad L, Magee AI, Severs NJ, Kodama I. Remodeling of gap junctional coupling of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2000;86:871-878.
60. Saffitz JE, Green KG, Kraft WJ, Schechtman KB, Yamada KA. Effects of diminished expression of connexin 43 on gap junction number and size in ventricular myocardium. *Am J Physiol*. 2000;278:H1662-H1670.
61. Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, Vozzi C, Coppen SR, Khan N, Kaprelian R, Yacoub MH, Severs NJ. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:359-371.
62. Kostin S, Scholz D, Shimada T, Maeno Y, Mollnau H, Hein S, Schaper J. The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes. *Cell Tissue Res*. 1998;294:449-460.
63. Green C, Peters N, Gourdie R, Rothery S, Severs N. Validation of immunohistochemical quantification in confocal scanning laser microscopy: a comparative assessment of gap junction size with confocal and ultrastructural techniques. *J Histochem Cytochem*. 1993;41:1339-1349.
64. Severs NJ, Gourdie RG, Harfst E, Peters NS, Green CR. Intercellular junctions and the application of microscopical techniques: the cardiac gap junction as a case model. *J Microsc*. 1993;169:299-328.
65. Kostin S, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Spatiotemporal development and distribution of intercellular junctions in adult rat cardiomyocytes in culture. *Circulation Research*. 1999;85:154-67.

66. Kostin S. The structural correlate of reduced cardiac function in failing human hearts. In: Takeda N, Nagano M, Dhalla NS, eds. *The hypertrophied heart*. Boston: Kluwer Academic Publisher; 2000: 423-439.
67. Luke RA, Saffitz JE. Remodeling of ventricular conduction pathways in healed canine infarct border zones. *J Clin Invest*. 1990;87:1594-1602.
68. Severs NJ. Gap junction alteration in the failing human heart. *Eur Heart J*. 1994;15:53-57.
69. Saffitz JE, Schuessler RB, Yamada KA. Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias. *Cardiovasc Res*. 1999;42:309-317.
70. Gardner PI, Ursell PC, Fenoglio JJ, Wit AL. Electrophysiologic and anatomic basis for fractionated electrograms recorded from healed myocardial infarcts. *Circulation*. 1985;72:596-611.
71. DeBakker MJT, Van Capelle FJL, Janse MJ, Tasserson S, Vermeulen JT, de Jonge N, Lahpor JR. Slow conduction in the infarcted human heart. "Zigzag" course of activation. *Circulation*. 1993;88:915-926.
72. Factor SM, Sonnenblick EH, Kirk ES. The histologic border zone of acute myocardial infarction-islands or peninsulas? *Am J Pathol*. 1978;92:111-124.
73. Spach MS, Josephson ME. The role of nonuniform anisotropy in small circuits. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1994;5:182-209.
74. Spach MS, Boineau JP. Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side connections: a major mechanism of structural heart disease. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1997;20:397-413.
75. Maron BJ, Anan TJ, Roberts WC. Quantitative analysis of the distribution of cardiac muscle cell disorganization in the left ventricular wall of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1981;63:882-894.
76. Kostin S. Morphological and morphometric characteristics of hypertrophic cardiomyopathy. *Arch Pathol*. 1989;51:47-53.
77. McKenna WJ, Camm AJ. Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. Assessment of patients at high risk. *Circulation*. 1989;80:1489-1492.
78. Kucera JP, Rudy Y. Mechanistic insights into very slow conduction in branching cardiac tissue. *Circ Res*. 2001;89:799-806.
79. Luke RA, Beyer EC, Hoyt RH, Saffitz JE. Quantitative analysis of intercellular connections by immunohistochemistry of the cardiac gap junction protein connexin43. *Circ Res*. 1989;65:1450-1457.



80. Peters NS. New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischaemic and hypertrophied human hearts. *Clin Sci*. 1996;90:447-452.
81. Wang X, Gerdes AM. Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in quinea pigs: III. Intercalated disc remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:333-343.
82. Lerner DL, Chapman Q, Green KG, Saffitz JE. Reversible down-regulation of connexin43 expression in acute cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20:93-97.
83. Fernandez-Cobo M, Gingalewski C, Drujan D, De Maio A. Downregulation of connexin 43 gene expression in rat heart during inflammation. The role of tumour necrosis factor. *Cytokine*. 1999;11:216-224.
84. Odeh M. Tumor necrosis factor-alpha as a myocardial depressant substance. *Int J Cardiol*. 1993;42:231-238.
85. Mann DL. The effect of tumor necrosis factor-alpha on cardiac structure and function: a tale of two cytokines. *J Card Fail*. 1996;2:165-172.
86. Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol*. 1998;274:
87. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ, 3rd, Zentella A, Albert JD. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*. 1986;234:470-474.
88. Abel FL. Myocardial function in sepsis and endotoxin shock. *Am J Physiol*. 1989;257:1265-1281.
89. Guerrero PA, Schuessler RB, Davis LM, Beyer EC, Johnson CM, Yamada KA, Saffitz JE. Slow ventricular conduction in mice heterogenous for a connexin43 null mutation. *J Clin Invest*. 1997;99:1991-1998.
90. Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res*. 2001;88:333-339.
91. Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klövekorn W-P, Bauer E-P, Schaper J. Gap junction remodeling and connexin 43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem*. 2003;242:135-144.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Rieger
Vorname	Markus
Geburtsdatum	09.12.1975
Geburtsort	Karlsruhe
Adresse	Virchowstr. 13 57074 Siegen
Telefon	+49 (0271) 2501527
Konfession	Evangelisch
Familienstand	ledig

### Schulbildung

1982 bis 1986	Grundschule Michelbach
1986 bis 1995	Klosterschule v. heiligen Grab Baden-Baden
Abschluss	Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulstudium

WS 1995 bis SS 2001	Studium der Humanmedizin an der Justus - Liebig - Universität Gießen
Juni 1997	Ärztliche Vorprüfung
März 1999	I. Staatsexamen
September 2001	II. Staatsexamen
WS 2001 - SS 2002	Praktisches Jahr am Ev. Jung-Stilling-Krankenhaus Siegen (nach Hochschulwechsel zur Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn)
November 2002	III. Staatsexamen

### Tätigkeiten

Juni 1999 - Dezember 2000	Doktorand und studentische Hilfskraft der Max Planck Gesellschaft, Abteilung für experimentelle Kardiologie Bad Nauheim. Thema der Arbeit: Qualitative und quantitative Veränderungen des Connexin-Besatzes im Glanzstreifen.
Seit 01.01.2002	Dozent an der Krankenpflegeschule des Ev. Jung-Stilling-Krankenhauses Siegen
Seit 01.01.2003	Angestellt als Arzt im Praktikum im Ev. Jung-Stilling-Krankenhaus Siegen (Abteilung für Chirurgie bis 30.06.2003, ab dem 01.07.2003 Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin)
WS 1995 - SS 2001	Mitarbeit in der studentischen Vertretung des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen herzlich danken, die auf unterschiedlichste Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Professor Dr. Dr. h.c. Jutta Schaper für die Überlassung des interessanten Themas und ihre herzliche und intensive Betreuung im Verlauf der Erstellung dieser Dissertation, sowie für die optimalen Arbeitsbedingungen in ihrer Arbeitsgruppe.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper für die Erlaubnis zur Teilnahme an verschiedenen Kongressen und Weiterbildungen, die für die Arbeit an diesem Thema sehr hilfreich und motivierend waren.

Der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. für die gewährte finanzielle Unterstützung während dieser Zeit.

Herrn Dr. Sawa Kostin, der mir immer tatkräftig zur Seite stand und mir sehr viel gezeigt und erklärt hat, und nicht zuletzt für die freundliche Überlassung seiner EM-Bilder zur Komplettierung dieser Arbeit. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer vorstellen können!

Herrn Gunther Schuster und Herrn Gerhard Stämmeler für ihre Hilfe bei der Durchführung der statistischen Überprüfung meiner Ergebnisse sowie bei allen computer-technischen Problemen.

Frau Beate Grohman und Frau Brigitte Matzke für die Einführung in die immunhistologischen Arbeitstechniken und die konfokale Mikroskopie.

Den Mitarbeitern innerhalb unserer Arbeitsgruppe für die freundschaftliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre, in der niemand allein gelassen wird. Besonders seien hier Frau Dr. Gabriele Klein, Sebastian Dammer, sowie Frau Dr. Veronika Person für die oft sehr hilfreichen Diskussionen erwähnt.

Ingrid Rieger und Reinhold Bernhard für ihre Hilfe bei der Korrektur.

Meinen Eltern, die mir diesen Weg ermöglicht haben und mich bei meinen Vorhaben immer unterstützt haben.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.